

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

**“POTENCIAL ANTIPARASITARIO DE LOS
METABOLITOS EXTRACELULARES DE
ACTINOMICETOS AISLADOS DE ESPONJAS MARINAS
FRENTE A *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.)
braziliensis*”**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo – Microbiólogo y Parasitólogo

AUTOR

Nadia Regina Galindo Cabello

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

POTENCIAL ANTIPARASITARIO DE LOS METABOLITOS EXTRACELULARES DE ACTINOMICETOS AISLADOS DE ESPONJAS MARINAS FRENTE A *Leishmania (Viannia)* *peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo – Microbiólogo y
Parasitólogo

Bachiller NADIA REGINA GALINDO CABELLO

Asesor: Magíster Jorge León Quispe

Coasesor: Magíster Gloria Minaya Gómez

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

A mi querida familia por hacer todo lo posible y apoyarme en todos mis
sueños y anhelos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme la vida, protegerme y guiarme.

A mis amados padres Alejandro y Carmen, por darme su interminable cariño, amor y amistad. Por sus palabras y gestos de bondad a lo largo de todos estos años.

A mi querido hermano mayor Dorian, quien desde hace años ha cumplido un rol de padre y siempre me ha dado lo mejor. Gracias por estar siempre pendiente y apoyándome.

A Fernandito, por darme tantas alegrías y recordarme lo bonita que es la infancia.

A toda mi familia de Lima y Andahuaylas, por preocuparse y velar por mí.

A mi Asesor y segundo padre Mg. Jorge León Quispe, por su inmenso apoyo en todos los proyectos que emprendí desde mi inicio en el laboratorio. Gracias por darme su confianza y nunca dudar de mis capacidades.

A mi coasesora Mg. Gloria Minaya Gómez, por su confianza y hacer todo lo posible para brindarme lo necesario durante la ejecución de mi proyecto.

Al Blgo. Nyshon Rojas Palomino, por apoyarme siempre además de darme las orientaciones y ánimos necesarios para continuar.

A mis queridas amigas y hermanas Karen y Berna, por ser las mejores compañeras de tesis y compartir sus conocimientos y alegrías.

A la profesora Mónica Huamán, por todos sus consejos, apoyo y dedicación durante todos estos años.

A todos mis amigos del Laboratorio de Ecología Microbiana Ula, Abi, Caro, Mirko y a todos los demás, gracias por brindar lo mejor de sí durante todo este tiempo.

Al Dr. Julio Santiago, por brindarme su apoyo total para la obtención de los extractos orgánicos.

A Marlene, Yuri, Milan y todos los miembros de su laboratorio, por siempre estar pendientes de mis avances y logros.

A los miembros de mi Jurado, por hacer todo posible y apoyarme en esta última etapa.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por financiar este proyecto.

Al Instituto Nacional de Salud, por brindar las facilidades para complementar este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	4
2.1	Leishmaniosis	4
2.1.1	Situación en el Perú	6
2.1.2	Tratamiento	7
2.2	Actinomicetos	8
2.2.1	Clasificación taxonómica	8
2.2.2	Descripción general	8
2.2.3	Actinomicetos marinos	9
2.2.4	Actinomicetos productores de metabolitos con actividad antiparasitaria	11
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
3.1	Hipótesis	15
3.2	Objetivos	15
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	16
4.1	Materiales	16
4.1.1	Material biológico	16
4.2	Métodos	17
4.2.1	Proceso fermentativo y obtención de extractos orgánicos	17
4.2.2	Pruebas de actividad antiparasitaria	17
4.2.3	Caracterización del cultivo de actinomiceto	19

4.2.4	Caracterización química preliminar del compuesto con actividad antiparasitaria	22
V.	RESULTADOS	24
5.1	Selección de cepas de actinomicetos por su actividad antiparasitaria	24
5.2	Prueba de actividad antiparasitaria frente a <i>Leishmania (V.) peruviana</i>	27
5.2.1	Comparación entre extracto butanólico a 30 000µg/mL y 15 000 µg/mL.	29
5.3	Prueba de actividad antiparasitaria frente a <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	32
5.3.1	Comparación entre extracto butanólico a 30 000 µg/mL y 15 000 µg/mL.	34
5.4	Caracterización de cultivos de actinomicetos	37
5.4.1	Caracterización fenotípica	37
5.4.2	Microscopia electrónica	39
5.4.3	Identificación molecular	41
5.5	Caracterización química preliminar del compuesto con actividad antiparasitaria	41
VI.	DISCUSIÓN	43
6.1	Actividad antiparasitaria	43
6.2	Caracterización fenotípica y genotípica	48
6.3	Caracterización química preliminar	49
VII.	CONCLUSIONES	52
VIII.	RECOMENDACIONES	53
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
X.	ANEXOS	62

ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud

Sb^V: Antimoniales pentavalentes

MGM: Megalomicina

UV: Ultravioleta

µm : Micrómetro

rpm: Revoluciones por minuto

mL: Mililitro

DMSO: Dimetilsulfóxido

cel/mL: Células por mililitro

µg/mL: Microgramo por mililitro

g/L: Gramo por litro

M: Molar

kV: Kilovoltio

ADN: Ácido desoxirribonucleico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

p/v: Peso por volumen

nm: Nanómetro

v/v: Volumen a volumen

C. cresc: Control de crecimiento

C. inh: Control de inhibición

Sch+CM: Medio Scheneider's y caldo marino

SEM: Microscopio Electrónico de Barrido

pb: Pares de bases

IC₅₀: Concentración Inhibitoria 50

μM: Micromolar

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa

mg/mL: miligramo por mililitro

kDa: kilo Dalton

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Nuevos metabolitos producidos por actinomicetos marinos durante el período 2005-2010. Fuente: Subramani & Aalbersberg, 2012.	11
Tabla 2. Promedios de los conteos diarios para cada tratamiento de la prueba de actividad antiparasitaria de extracto diclorometánico y butanólico de la cepa EIIB frente a <i>Leishmania (V.) peruviana</i>	27
Tabla 3. Promedios de los conteos diarios para cada tratamiento de la prueba de actividad antiparasitaria de extracto diclorometánico y butanólico de la cepa EIIB frente a <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	32
Tabla 4. Actividad enzimática presentada por la cepa EIIB	39

Figura 1. Estructura química de la Avermectina. Fuente: Burg <i>et al.</i> , 1979	12
Figura 2. Estructura química de la Megalomicina. Fuente: Bonay <i>et al.</i> , 1998.	14
Figura 3. Prueba de actividad antiparasitaria de fermentos frente a <i>Leishmania (V.) peruviana</i>	25
Figura 4. Prueba de actividad antiparasitaria de fermentos frente a <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	26
Figura 5. Prueba de actividad antiparasitaria de extracto diclorometánico y butanólico de la cepa EIIB frente a <i>Leishmania (V.) peruviana</i> .	28
Figura 6. Prueba de actividad antiparasitaria del extracto butanólico de la cepa EIIB a concentraciones 30 000 y 15 000 µg/mL frente a <i>Leishmania (V.) peruviana</i> .	29
Figura 7. Prueba de actividad antiparasitaria de extracto diclorometánico y butanólico de la cepa EIIB frente a <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> .	33
Figura 8. Prueba de actividad antiparasitaria del extracto butanólico de la cepa EIIB a concentraciones 30 000 y 15 000 µg/mL frente a <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> .	34
Figura 9. Cepa EIIB en Agar Marino, obsérvese la apariencia yesosa y pulverulenta del micelio aéreo.	37
Figura 10. Observación de las características microscópicas de la cepa EIIB.	38
Figura 11. Cultivo de 2 días de cepa EIIB vista al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM).	40
Figura 12. Cultivo de 7 días de la cepa EIIB.	40
Figura 13. Cultivo de 7 días de la cepa EIIB.	40
Figura 14. Lectura al espectrofómetro en el rango de 190 a 750 nm.	42
Figura 15. Estructuras químicas de clásicas aminocumarinas. Fuente: Collin <i>et al.</i> , 2011.	50

RESUMEN

Los actinomicetos son reconocidos como productores de compuestos de importancia farmacológica e industrial. En las últimas décadas el descubrimiento de nuevos metabolitos provenientes de actinobacterias aisladas del medio terrestre ha disminuido y la investigación se ha orientado a buscar en hábitats poco explorados como el medio marino. Dado que la gran mayoría de compuestos producidos por actinobacterias son antimicrobianos y pocos son los reportes de actividad antiparasitaria, el presente trabajo tiene como objetivo determinar el potencial antiparasitario de los metabolitos extracelulares de actinomicetos aislados de esponjas marinas frente a *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*. Para ello se evaluó preliminarmente la actividad antiparasitaria *in vitro* de las cepas 13 A1, EIIIA, EIIB y EIIC frente a promastigotes de las dos especies de *Leishmania*, siendo la cepa EIIB la que presentó mayor actividad inhibitoria. Mediante pruebas moleculares la cepa EIIB fue identificada como miembro del género *Streptomyces*. La mínima concentración del extracto butanólico del actinomiceto EIIB que presentó la actividad anti-*Leishmania* fue de 15 000 µg/mL para *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*. La caracterización química preliminar del extracto confirmó la presencia de cumarinas.

En conclusión, los resultados demuestran la producción de metabolitos con actividad antiparasitaria procedentes de actinomicetos asociados a esponjas, los cuales tienen potencial en el campo biomédico y farmacológico.

Palabras clave: *Streptomyces*, promastigote, leishmanicida, cumarinas.

ABSTRACT

The Actinomycetes are recognized as producers of pharmacological and industrial compounds. In the last decades, the discovery of new metabolites isolated from the terrestrial actinomycetes has decreased and the researches have focused on searching unexplored habitats, like the marine environment. The vast majority of compounds produced by actinomycetes are antimicrobial and few have antiparasitic activity. This study aims at determining the antiparasitic potential of actinomycetal extracellular metabolites isolated from marine sponges against *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (V.) braziliensis*. In order to carry out this study, we made a preliminary evaluation of antiparasitic activity *in vitro* with 13A1, EIIIA, EIIB and EIIC strains against promastigotes of two species of *Leishmania*; the results of this test showed that EIIB strain had the higher inhibitory activity. The EIIB strain was identified as a member of the genus *Streptomyces* using rRNA method. The minimum concentration of butanolic extract of actinomycete EIIB who filed the anti-Leishmania activity was 15 000 µg/mL for *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (V.) braziliensis*. The preliminary chemical characterization of the extract confirmed the presence of coumarins.

In conclusion, the results demonstrated the production of metabolites from actinomycetes associated with sponges with antiparasitic activity, which have a great potential in the biomedical and pharmacological field.

Keywords: *Streptomyces*, promastigote, leishmanicidal, coumarins.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas, a pesar de progreso dramático en su tratamiento y prevención, constituyen una causa importante de muerte y morbilidad de millones de personas alrededor del mundo. En pleno Siglo XXI, continúan siendo prevalentes a nivel mundial, particularmente en países en vías de desarrollo. El avance científico y tecnológico en las tres últimas décadas ha permitido contar con modernos métodos de diagnóstico logrando combatir mejor las diferentes enfermedades infecciosas; sin embargo, se observa la emergencia de nuevos agentes infecciosos y la re-emergencia de otros, constituyéndose en un desafío para los especialistas en enfermedades infecciosas (Salazar, 2008).

La leishmaniosis es una enfermedad metaxénica mundial de las zonas tropicales y subtropicales (Bates, 2007). Debido a la prevalencia de la enfermedad, una décima parte de la población mundial (700 millones de personas) se encuentra en riesgo de infección (O'Daly & Spinetti, 2013). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial existen 12 millones de personas infectadas y la incidencia de nuevos casos cada año para leishmaniosis visceral es de 0,5 millones y para leishmaniosis cutánea es entre 1 y 1,5 millones aproximadamente (WHO, 2012; Desjeux, 2004).

El tratamiento de primera línea para el control de la leishmaniosis es la quimioterapia, el cual consiste en la aplicación de antimoniales pentavalentes (Sb^{V}) y sus derivados; sin embargo su administración causa efectos secundarios como mialgia, pancreatitis, insuficiencia renal, neuropatía periférica, hepatotoxicidad y cardiotoxicidad (Croft *et al.*, 2006). Por otro lado, los informes sobre la

incidencia del fracaso del tratamiento con estos fármacos es cada vez mayor (Arévalo *et al.*, 2007), habiéndose reportado a la fecha varios estudios en Latinoamérica. Los grados de fracaso reportados son bastante evidentes contra Leishmaniosis cutánea; tal es así que los autores señalan fracaso del 7% del tratamiento en Bolivia (Bermúdez *et al.*, 2006), 16% en Brasil (Oliveira-Neto, 1997) y hasta un 39% en Colombia (Palacios, 2001). En el caso de Perú, la proporción de fracaso del tratamiento de antimonial pentavalente reportado para especies de *Leishmania (Viannia)* es como sigue: 30,4% para *L. (V.) braziliensis*, 24,5% para *L. (V.) peruviana* y 8.3% para *L. (V.) guyanensis* (Arévalo *et al.*, 2007). En consecuencia, el tratamiento de la leishmaniosis constituye un serio problema para la salud pública, siendo una necesidad imperiosa la búsqueda de nuevas drogas que reemplacen el tratamiento actual, o al menos complementen de manera tal que sean más eficaces y cada vez menos tóxicas.

Las esponjas marinas (Phylum Porifera) son conocidas por ser una poderosa fuente de metabolitos secundarios bioactivos de interés biotecnológico por sus propiedades antiviral, antitumoral, citotóxica y antimicrobiana (Wang, 2006). Si bien una gran gama de metabolitos en esponjas han sido descubiertos hasta la fecha, sólo algunos han llegado a ser comercializados (Gandhimathi *et al.*, 2008). Algunos de estos metabolitos han sido identificados por ser naturalmente productos microbianos, lo que lleva a especular que algunos de estos metabolitos sean originados por sus microorganismos asociados (Taylor *et al.*, 2007). A ello se añaden estudios que apoyan la hipótesis que las bacterias asociadas a esponjas sintetizan los compuestos específicos propios de este invertebrado de manera

completa o en forma de precursores que serian completados posteriormente por el metabolismo de la esponja (Muscholl – Silverhorn, 2008). Es por esta razón que la búsqueda de simbioses bacterianas en esponjas marinas se ha intensificado a la actualidad.

De todos los grupos microbianos que habitan en las esponjas marinas, el que muy probablemente ha recaudado mayor interés debido a su importancia farmacológica es de las actinobacterias, reconocidos por su prolífica capacidad de producción de compuestos bioactivos. Por el conocimiento obtenido hasta la actualidad, los actinomicetos de origen marino conforman un grupo bacteriano con capacidades metabólicas y fisiológicas únicas que les permite no sólo sobrevivir en condiciones extremas, sino también producir compuestos con actividades farmacológicas nunca antes vistos en microorganismos terrestres (Olano *et al.*, 2009).

Los actinomicetos han sido fuente de innumerables metabolitos usados en la industria de los fármacos, la mayoría de los cuales son antibióticos, de tal manera que dos tercios de los antibióticos que se conocen han sido aislados de este grupo de microorganismos (Watve, 2001).

En la literatura científica existen escasos reportes de compuestos bioactivos producidos por actinomicetos marinos con actividad antiparasitaria. Uno de estos productos es la Megalomicina (MGM), un antimicrobiano que ha mostrado tener un amplio espectro antiparasitario (Bonay *et al.*, 1998). Recientes estudios revelan la importancia de nuevos productos con actividad antiparasitaria; tal es el caso de valinomicina, estaurosporina y butanolido, compuestos obtenidos de actinomicetos marinos que han mostrado tener actividad específicamente contra

Leishmania major y *Trypanosoma brucei brucei* (Pimentel-Elardo *et al.* 2010). Como los casos anteriores, se pueden encontrar nuevos metabolitos con capacidad antiparasitaria, representando objeto de investigación para la búsqueda de nuevos metabolitos que en el futuro puedan tener alguna aplicación médica (Bonay *et al.*, 1998, Takizawa *et. al.*, 1993).

Esto induce a seguir buscando y evaluando actinomicetales con capacidad de producir nuevos y mejores metabolitos con actividad antiparasitaria, ya que aún no se han encontrado referencias respecto al efecto leishmanicida de actinomicetos procedentes del Perú, por esta razón se planteó como objetivo determinar el potencial antiparasitario de los metabolitos extracelulares de actinomicetos marinos frente a *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad causada por protozoarios parásitos del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos al hombre y otros mamíferos por la picadura de insectos vector de la subfamilia *Phlebotominae* (Anexo 1). En nuestro país los vectores naturales de la leishmaniosis tegumentaria son: *Lutzomyia ayacuchensis*, *Lu. peruensis*, *Lu. tejadai* (Cáceres & Galati, 2001) y *Lu. verrucarum*.

La leishmaniosis representa uno de los principales problemas de salud pública. De acuerdo con la OMS, uno de cada 10 personas a nivel mundial se

encuentra en riesgo de infección, aproximadamente 12 millones de personas en 88 países están infectadas y 2 millones de nuevos casos se presentan cada año, siendo los países de los trópicos y sub-trópicos los más afectados (Bates, 2007).

En el Perú, la leishmaniosis tegumentaria es una enfermedad endémica que se distribuye en el 74% del territorio nacional y en donde se encuentran la forma cutánea y mucocutánea de esta enfermedad. Hasta fines de los años 80's, la mayoría de casos reportados fueron causados principalmente por las especies *Leishmania (Viannia) braziliensis* para la forma mucocutánea y *Leishmania (Viannia) peruviana* para la forma cutánea; sin embargo, otras especies como *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni* y *Leishmania (Viannia) amazonensis* son prevalentes en varios departamentos del país, y en donde además pueden prevalecer más de dos especies (Lucas, 1998).

La forma cutánea de la leishmaniosis se distribuye principalmente en las regiones de la costa oriental, mientras que los casos de leishmaniosis mucosa se presentan en la región la selva, con una alta incidencia en los departamentos de Iquitos, Ucayali y Madre de Dios (Lucas, 1998).

La mayoría de casos presentados a lo largo del Perú son por la forma cutánea en comparación con los casos de leishmaniosis mucosa. Muchas veces, los casos cutáneos de la enfermedad pueden evolucionar a casos mucosos, en este caso se habla de leishmaniosis mucocutánea, forma clínica que ha disminuido en los últimos años (Arévalo *et al.*, 2007).

2.1.1 Situación en el Perú

Actualmente la Leishmaniosis es una enfermedad endémica en muchos países de Latino América, siendo Perú uno de ellos. Son 3 las especies que tienen importancia predominante: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) guyanensis* (Arévalo *et al.*, 2007). Son causantes de lesiones cutáneas, cuya evolución clínica se caracteriza por un gradiente de gravedad, siendo la infección por *L. (V.) peruviana* generalmente lesiones pequeñas que pueden auto cicatrizar (Silveira, 2004); en cambio las lesiones causadas por *L. (V.) guyanensis* pueden convertirse en leishmaniosis difusa cutánea, la cual se caracteriza por lesiones nodulares diseminadas que no cicatrizan espontáneamente y que reaparecen después del cese del tratamiento (Croft *et al.*, 2006); finalmente las lesiones causadas por *L. (V.) braziliensis* causan metástasis hasta en 10% de los casos, lo que resulta muchas veces en la mutilación de lesiones de la mucosa (conocidas como "espundia"). *L. (V.) peruviana* se encuentra principalmente en los valles rurales andinos e interandinos (entre 1000 y 3000 msnm), mientras que las otras 2 especies son endémicas en regiones selváticas. Sin embargo, este cuadro epidemiológico puede verse afectado por los cambios ambientales y las migraciones humanas (Desjeux, 2004).

En el Perú, la leishmaniosis es la segunda endemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles luego de la malaria y la tuberculosis (Neyra, 1997). Entre enero del 2003 a diciembre

del 2012, se ha reportado a nivel nacional, un acumulado de 77 665 casos probables y confirmados de leishmaniosis, correspondiendo el 94,9% de los casos a la forma cutánea (andina o «uta» y selvática) y el 5,1% a la forma mucosa (Salud, M.D, 2013). Según la Red Nacional de Epidemiología (RENACE)-DGE-MINSA (Ministerio de Salud del Perú, DGE), durante el 2013, hasta la semana epidemiológica 52, se reportaron 6450 casos de leishmaniosis; la mayoría de casos se reportó en Madre de Dios con 934, seguida de Cusco con 890 y San Martín con 580.

2.1.2 Tratamiento

El tratamiento actual de la leishmaniosis consiste en la administración de antimoniales pentavalentes, sin embargo en los pacientes causa efectos secundarios como mialgia, pancreatitis, insuficiencia renal, neuropatía periférica, hepatotoxicidad y cardiotoxicidad (Croft, 2002). En la actualidad existen varias drogas que han sido ensayadas para el tratamiento quimioterápico, sin embargo, muchas de ellas son formulaciones de drogas diseñadas hace 50 años; además se han presentado resistencia a las drogas clásicamente empleadas, lo cual hace necesaria la búsqueda de nuevos medicamentos que reemplacen o complementen el tratamiento actual (Croft, 2002).

La proporción de fracaso del tratamiento en el Perú por especies de *Leishmania* (*Viannia*) es como sigue: 30,4% de fracaso frente a *L. (V.) braziliensis*, 24,5% a *L. (V.) peruviana* y 8,3% a *L. (V.) guyanensis*. Se reporta también que el porcentaje de cura al tratamiento con los

antimoniales pentavalentes usados actualmente en el Perú es de 69,6% para *L.(V) braziliensis*, 75,5% para *L. (V) peruviana* y de 91,7 % para *L(V) guyanensis* (Arévalo *et al.*, 2007).

Por otra parte, la resistencia a fármacos también se ha informado recientemente, debido a que la mayoría de los fármacos disponibles son caros, el tratamiento es largo y está acompañado por efectos secundarios graves, además son menos eficaces; existe la necesidad en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos contra leishmania (Gurvitz, 2009).

2.2 Actinomicetos

2.2.1 Clasificación taxonómica:

Phylum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Orden: Actinomycetales (Buchanan, 1974)

2.2.2 Descripción general

Los actinomicetos son un grupo de microorganismos ampliamente distribuido en ecosistemas naturales; son abundantes en el suelo, sin embargo, son encontrados también en ambientes acuáticos, dulces y marinos (Leiva *et al.*, 2004). Dentro de sus características particulares se encuentra la producción de muchos compuestos bioactivos importantes, a tal punto que dos tercios de los antibióticos que se conocen han sido aislados de este grupo de microorganismos (Jensen *et al.*, 2005).

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, son bacterias Gram positivas (aunque esta reacción puede variar con la edad del cultivo), que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados, que en algunos casos desarrollan micelio.

Actualmente los actinomicetos se encuentran incluidos en el Dominio Bacteria debido a las siguientes características: su pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior a la de los hongos (0,5 a 2 μm), son sensibles a los antimicrobianos, aunque presentan resistencia a los antifúngicos y finalmente la disposición de su material genético es típico de los procariontes (Sylvia, 2005).

Estas bacterias se encuentran estableciendo relaciones simbióticas con sus hospederos, principalmente invertebrados, tal como ocurre con las esponjas (Gandhimathi *et al.*, 2008). Muchos de sus metabolitos han sido considerados productos microbianos naturales de importancia en biotecnología farmacéutica (Kim *et al.*, 2005; Montalvo *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008).

2.2.3 Actinomicetos marinos

Aunque el primer reporte de actinobacterias marinas con micelio, fue procedente de sedimentos marinos hace ya varias décadas (Weyland, 1969); a la fecha su aislamiento abarca otras fuentes naturales tales como peces, moluscos, esponjas, algas, manglares, agua de mar, entre (Dharmaraj, 2010).

Los actinomicetos tienen un papel importante en el medio marino, ya que intervienen en la degradación de material orgánico e inorgánico, interaccionando continuamente con diversos microorganismos (Jensen *et al.*, 2005). Por lo tanto, es natural que se hayan reportado actinomicetos marinos con actividad celulolítica, quitinolítica, entre otros tipos de enzimas industrialmente importantes (Subramani & Aalbersberg, 2012). Además, desempeñan un papel importante en la mineralización de la materia orgánica, la inmovilización de nutrientes minerales, la fijación de nitrógeno y mejoramiento de los parámetros físicos (Goodfellow & Williams, 1983).

Actualmente estos organismos están ganando importancia, no sólo por sus perspectivas taxonómicas y ecológicas; sino también por ser una fuente de nuevos metabolitos, debido a la diversidad estructural como el amplio rango de actividades biológicas que incluyen antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, antitumorales, compuestos citotóxicos, citostáticos, antiinflamatorios, antiparasitarios, antimaláricos, antivirales, antioxidantes, anti-angiogénesis, etc (Manivasagan *et al.*, 2013; Solanki *et al.*, 2008). Es así como en el trabajo de (Subramani & Aalbersberg, 2012) se realiza un consolidado de nuevos metabolitos producidos por actinomicetos marinos durante el periodo 2005 – 2010 (Tabla 1). En este consolidado se hace referencia a nuevos compuestos, la mayoría producidos por los géneros *Streptomyces* y *Salinispora*, presentando además sus actividades biológicas ya conocidas y en algunos casos aún desconocidas.

Tabla 1. Nuevos metabolitos producidos por actinomicetos marinos durante el período 2005-2010. Fuente: Subramani & Aalbersberg, 2012.

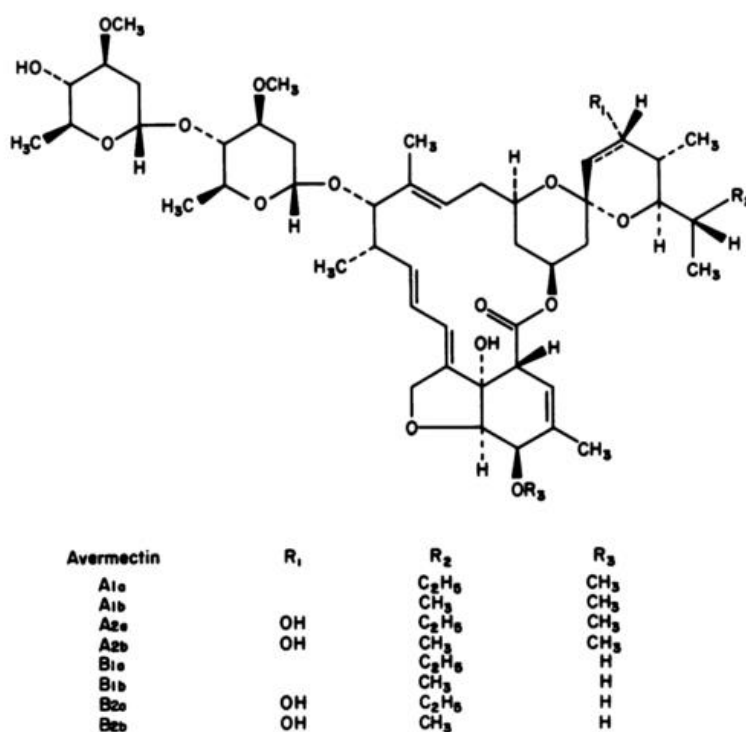
Compound	Source	Biological activity	Reference
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer	Li et al. (2005)
Chloro-dihydroquinones	Novel actinomycete	Antibacterial; anticancer	Soria-Mercado et al. (2005)
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial	Macherla et al. (2005)
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial	Bruntner et al. (2005)
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial	Manam et al. (2005)
Mechercharmycins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer	Kanoh et al. (2005)
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer; antimalarial	Jensen et al. (2007) and Prudhomme et al. (2008)
Sporolide A	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown	Jensen et al. (2007)
Salinosporamides B & C	<i>Salinispora tropica</i>	Cytotoxicity	Williams et al. (2005)
2-Allyloxyphenol	<i>Streptomyces</i> sp.	Antimicrobial; food preservative; oral disinfectant	Arumugam et al. (2009)
Saliniketal	<i>Salinispora arenicola</i>	Cancer chemoprevention	Jensen et al. (2007)
Marinomycins A-D	<i>Marinispora</i>	Antimicrobial; anticancer	Kwon et al. (2006)
Cyanosporaside A	<i>Salinispora pacifica</i>	Unknown	Jensen et al. (2007)
Lodopyridone	<i>Saccharomonospora</i> sp.	Anticancer	Maloney et al. (2009)
Arenimycin	<i>Salinispora arenicola</i>	Antibacterial; anticancer	Asolkar et al. (2010)
Salinispyrone	<i>Salinispora pacifica</i>	Unknown	Jensen et al. (2007)
Salinipyrones A & B	<i>Salinispora pacifica</i>	Mild cytotoxicity	Oh et al. (2008)
Pacificanones A & B	<i>Salinispora pacifica</i>	Antibacterial	Oh et al. (2008)
Arenicolides A-C	<i>Salinispora arenicola</i>	Mild cytotoxicity	Jensen et al. (2007) and Williams et al. (2007)
1-hydroxy-1-norresistomycin	<i>Streptomyces chinaensis</i>	Antibacterial; anticancer	Gorajana et al. (2005) and Kock et al. (2005)
Resistoflavin methyl ether	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anti-oxidative	Kock et al. (2005)
Staurosporinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor; phycotoxicity	Wu et al. (2006)
Sesquiterpene	<i>Streptomyces</i> sp.	Unknown	Wu et al. (2006)
1,8-Dihydroxy-2-ethyl-3-methylanthraquinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor	Huang et al. (2006)
Caboxamycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anticancer	Hohmann et al. (2009)
Butenolides	<i>Streptoverticillium luteovorticillatum</i>	Antitumor	Li et al. (2006)
Daryamides	<i>Streptomyces</i> sp.	Antifungal; anticancer	Asolkar et al. (2006)
Piericidins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor	Hayakawa et al. (2007a)

2.2.4 Actinomicetos productores de metabolitos con actividad antiparasitaria

Los actinomicetos son un grupo de bacterias conocidas por su capacidad de producir sustancias biológicas de gran importancia económica como vitaminas, enzimas y antibióticos (Urbina, 2003). Respecto a este último tenemos a la eritromicina, aislada por Mc Guire *et al.*, (1952) a partir de una cepa de *Streptomyces erythraeus*, sin embargo ésta, al igual que

otros antibióticos, no ha mostrado tener una efectiva actividad antiparasitaria (Bonay, 1998).

En la literatura científica existen escasos reportes de estos compuestos bioactivos con actividad antiparasitaria; sin embargo, algunos son usados actualmente, como es el caso de la avermectina (Figura 1), producida por *Streptomyces avermitilis* que fue aislado del suelo en Shizuoka-Japón en 1978.



Where R₁ is absent, the double bond (====) is present.
Both sugars are α-L-oleandrose.

Figura 1. Estructura química de la Avermectina. Fuente: Burg *et al.*, 1979

Este es un compuesto de 16 policétidos macrocíclicos que posee una buena potencia y amplio espectro de actividad contra diversos nemátodos

y artrópodos parásitos; siendo reportado completamente activo contra el nemátodo gastrointestinal *Nematospiroides dubius*, cuando los ratones infectados fueron tratados durante 6 días con una dieta suplementada con avermectina al 0,0002% (Burg *et al.*, 1979). Cabe mencionar que la avermectina no presentó actividad frente a bacterias y hongos, ya que no inhibió la síntesis de proteínas; pero se reportó que si interfiere con la neurotransmisión en varios invertebrados, siendo probado frente a nemátodos y artrópodos parásitos en perros, ovejas, vacas, caballos y cerdos (Demain, 1999). Debido a la eficacia de la avermectina, se produjeron derivados semisintéticos como la Ivermectina (22,23-dihidro-avermectina B₁), siendo mucho más efectivo que el Tiabendazol, un antihelmíntico veterinario comercial (Demain, 1999). Finalmente la avermectina además tiene un bajo nivel de efectos secundarios en el organismo hospedero (Yoon *et al.*, 2004).

Weinstein *et al.*, (1969), aislaron a partir del actinomiceto *Micromonospora megalomicea* la megalomicina (MGM) (Figura 2), un macrólido de amplio espectro antimicrobiano perteneciente a la misma familia de antibióticos que la eritromicina. Dado el mecanismo de acción de MGM, que obstaculiza el transporte vehicular a nivel del aparato de Golgi, Bonay *et al.*, (1998), probaron su actividad antiparasitaria contra cepas de *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania major*, *L. donovani* y *Plasmodium falciparum* obteniendo una mayor actividad contra *T. cruzi*; tanto en el estadio epimastigote, donde obtuvieron un IC₅₀ de 0,2 µg/mL,

como en el amastigote, donde se detuvo por completo la replicación usando una concentración de 5 µg/mL; acorde con estos resultados; Bonay *et al.*, (1998), sugieren a la MGM como un fármaco potencial para el tratamiento de la tripanosomiasis americana.

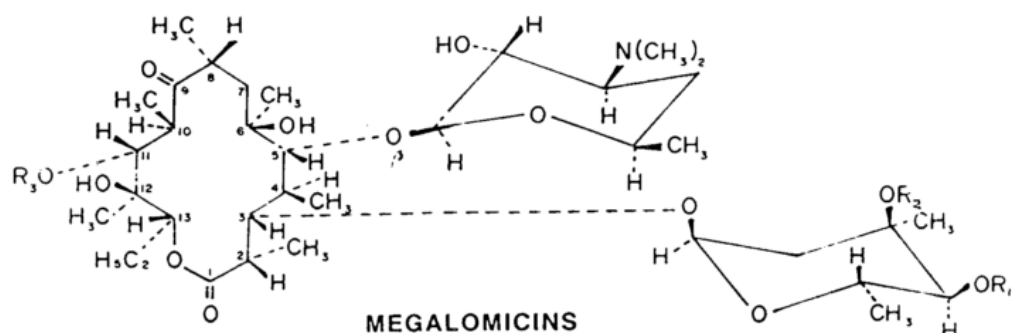


Figura 2. Estructura química de la Megalomicina. Fuente: Bonay *et al.*, 1998.

En los años posteriores, las investigaciones sobre la potencialidad antiparasitaria de los metabolitos marinos estuvieron restringidas. En los últimos años, Pimentel-Elardo *et al.*, (2010) aislaron cepas de *Streptomyces* sp. asociadas a esponjas con actividad anti-parasítica específicamente contra *Leishmania major* y *Trypanosoma brucei brucei*; estos metabolitos fueron identificados como valinomicina, estaurosporina y butanolido. Abdelmohsen *et al.*, (2010), reportan el aislamiento de otra actinobacteria del género *Rubrobacter* a partir de esponjas; cuyos metabolitos mostraron amplia actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria, siendo este último efectivo frente a *Leishmania* y *Trypanosoma*.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los actinomicetos aislados de esponjas marinas son fuente de metabolitos con actividad antiparasitaria contra los cultivos en estadio promastigote de *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*.

3.2 Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vitro* el potencial antiparasitario de los metabolitos extracelulares de actinomicetos marinos frente a cultivos de promastigotes de *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la actividad anti-*Leishmania* frente a promastigotes mediante ensayo tamiz de 4 cepas de actinomicetos aislados de esponjas marinas.
2. Determinar *in vitro* la actividad anti-*Leishmania* de los extractos orgánicos a concentraciones de 15 000 y 30 000 µg/mL frente a promastigotes de *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*.
3. Caracterizar fenotípica y genotípicamente el actinomiceto seleccionado por su actividad anti-*Leishmania* frente a promastigotes.
4. Caracterizar preliminarmente los compuestos del extracto butanólico con actividad anti-*Leishmania* frente a promastigotes.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

Cepas de actinomicetos

Los actinomicetos utilizados en el presente estudio fueron originalmente aislados de esponjas marinas (calcáreas), las cuales fueron colectadas en dos diferentes localidades de la costa peruana (Bahía de Ancón y Reserva Natural de Paracas) en el mes de Septiembre del 2011. Las características de colecta de esponjas, así como del procesamiento y aislamiento respectivo de los actinomicetos en el laboratorio se encuentran descritas en el Informe Técnico 2012 del Proyecto de Estudios del Vicerrectorado de Investigaciones de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (RR N° 00715-R-12, Código 121001281). Para el presente estudio se seleccionaron 4 cepas de actinomicetos identificadas con los códigos: 13A1, EIIIA, EIIB y EIIC, las cuales fueron propagadas y conservadas en Agar Marino para evaluar su actividad antiparasitaria en estudios posteriores.

Cepas de *Leishmania*

Se emplearon las cepas *Leishmania (Viannia) peruviana* MHOM/PE/84/LC 26 y *Leishmania (Viannia) braziliensis* MHOM/PE/84/LC 53. Todas procedentes del Laboratorio de Leishmaniosis – Instituto Nacional de Salud (INS), Ministerio de Salud (MINSA).

4.2 Métodos

4.2.1 Proceso fermentativo y obtención de extractos orgánicos

Se realizó usando la metodología recomendada por Das *et al.*, (2006). Se generaron cultivos “starter” de las cepas seleccionadas inoculando en un erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo marino suplementado con glucosa 0,5% (p/v). Se colocó en agitación a 200 rpm por 48 horas. Posteriormente se agregó 3 mL del cultivo “starter” en un matraz erlenmeyer de 500 mL conteniendo 200 mL del mismo medio. Se dejó en agitación a 180 rpm por 7 días. El crudo de fermentación se utilizó para la extracción de los compuestos activos, para lo cual se centrifugó a 5 000 rpm por 25 minutos, luego se separó el caldo del pellet y se filtró con una membrana de 0,22 µm. Seguidamente el caldo de fermentación filtrado se sometió a extracción usando butanol y diclorometano. La fase orgánica fue concentrada usando rotavapor (Boeco RVO 400 SD) a 50 rpm a una temperatura de 40 °C y presión reducida. De cada proceso de extracción se determinó el peso seco del extracto obtenido. Seguidamente cada extracto fue re-suspendido en DMSO 5% (dimetilsulfóxido), filtrado con una membrana de 0,22 µm y fue conservado en congelación (León *et al.*, 2011).

4.2.2 Pruebas de actividad antiparasitaria

4.2.2.1 Condiciones de cultivo de *Leishmania*

Los cultivos *in vitro* de promastigotes de *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis* se realizaron en medio líquido

Schneider's Drosophila Medium (Gibco®) completo (suplementado con suero fetal bovino inactivado al 20%) (Kahla-Nakbi *et al.*, 2010).

4.2.2.2 Selección de cepas con actividad antiparasitaria

Para la selección de cepas de actinomicetos, primeramente se enfrentaron los fermentos a los cultivos de *Leishmania*. Esta prueba se realizó en placas con pocillos; probando cada fermento por duplicado. La concentración del inóculo del cultivo de parásitos en todos los pozos fue de 1×10^6 cel/mL. El control de inhibición fue estibogluconato sódico a la concentración de 20 000 µg/mL (Callahan *et al.*, 1997). La incubación se realizó a 28°C, la evaluación y conteo de parásitos fue cada 24 horas durante 7 días. Al finalizar la prueba, se seleccionó la cepa que presentó mayor inhibición, para posteriormente proceder con la obtención de los extractos orgánicos.

4.2.2.3 Pruebas con extractos orgánicos

La prueba de actividad inhibitoria con los extractos orgánicos se realizó en placas con pocillos. El extracto diclorometánico se evaluó a la concentración de 30 000 µg/mL por duplicado. El extracto butanólico se evaluó a dos concentraciones diferentes: i) 30 000 µg/mL y ii) 15 000 µg/mL; ambos por triplicado. Las condiciones de la prueba fueron las mismas que para la selección de cepas con actividad antiparasitaria.

4.2.2.4 *Análisis Estadístico*

Para el análisis estadístico, se utilizaron los datos de las pruebas con extractos orgánicos que presentaron actividad leishmanicida. El criterio utilizado fue la cantidad total de parásitos contados por día para cada tratamiento. Para comparar la actividad leishmanicida de los extractos orgánicos de actinomicetos en relación al control de inhibición (estibogluconato sódico), se llevó a cabo una prueba de comparación de rangos mediante el estadístico de Kruskal-Wallis para corroborar su actividad antiparasitaria. Finalmente, con los extractos que presentaron actividad antiparasitaria representativa, se realizaron comparaciones con los valores del control de crecimiento mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney y se determinó mediante un test HSD de Tuckey si los extractos analizados se asociaron de manera representativa con el Grupo de Control Negativo. La evaluación se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 19.0.

4.2.3 Caracterización del cultivo de actinomiceto

4.2.3.1 *Caracterización fenotípica*

Se realizó con la cepa que tuvo mayor actividad antiparasitaria. Las características morfológicas y fisiológicas del cultivo se realizaron siguiendo la metodología y la guía práctica para identificación de Actinomicetos según esquemas de Holt *et al.*, (1994). Las características culturales fueron descritas según su crecimiento en Caldo Marino y Agar Marino; además se evaluó la actividad enzimática empleando un agar

base (peptona 4 g/L, extracto de levadura 1 g/L, agar 15 g/L) suplementado diferencialmente para cada prueba: almidón (10g/L), celulosa (1%), gelatina, tween 80 (1%), caseína (1%), úrea (20 g/L). Se realizaron observaciones microscópicas a partir de microcultivos luego de su crecimiento por el método de “bloques de agar” e incubados en cámara húmeda a 28°C por 5 a 7 días.

4.2.3.2 Microscopia electrónica

Los micelios de los actinomicetos fueron fijados con solución de glutaraldehído al 2% con buffer fosfato 0,1 M durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Luego, se lavaron las muestras con buffer fosfato 0,2 M una vez durante 10 minutos. Se sometieron las muestras a una deshidratación gradual en alcoholes de 50, 70 y 90% durante 5 minutos cada uno y dos pasos de alcohol de 100% por 10 y 15 minutos respectivamente. Las muestras fueron mantenidas en la última solución de etanol hasta ser sometidas a desecación por punto crítico en el equipo EMS 850, usando CO₂. Luego se montaron las muestras sobre el soporte de aluminio (stub), al cual previamente se le puso cinta de carbón adhesiva de doble cara. Finalmente se procedió al recubrimiento de oro de la muestra, introduciéndola en la cámara del metalizador *Sputter Coater SPI*.

La observación de las muestras se realizó en el Laboratorio de Equipos Especializados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el microscopio electrónico de barrido

InspectTM S50 de marca FEI usando el sensor ETD (para electrones secundarios) con una carga de voltaje aproximada de 20kV. Se tomaron fotografías a distintos aumentos.

4.2.3.3 Identificación molecular

Purificación de DNA genómico. Las cepas fueron cultivadas en caldo TSB por 5 días a 28 °C y el protocolo estuvo sujeto a las indicaciones del kit de purificación de ADN Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®).

Amplificación del rRNA 16S. Se emplearon los primers 16S 8F (5`-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3`) y 16S 1492R(I) (5`-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3`). La reacción de PCR consistió en: desnaturalización inicial 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 40 segundos, amplificación a 72°C por 1 minuto, y amplificación final a 72°C por 5 minutos.

Secuenciación del gen rRNA 16S. Los amplificados fueron secuenciados en el Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud – Perú.

Caracterización molecular. Las secuencias consenso del gen rRNA 16S de la cepa seleccionada se corrigió manualmente usando el programa BioEdit 7.0.9 y se analizó la similitud con las secuencias depositadas en las bases de datos del GenBank (NCBI) mediante el algoritmo BLASTn.

4.2.4 Caracterización química preliminar del compuesto con actividad antiparasitaria

Se realizó con la cepa seleccionada que tuvo mayor actividad antiparasitaria. Para ello se preparó una solución acuosa resuspendiendo el extracto seco en agua destilada, el cual fue sometido a pruebas químicas preliminares (determinación de triterpenoides, leucoanticianidinas, quinonas, saponinas, antraquinonas, flavonoides, alcaloides y cumarinas). Se tuvo especial énfasis en la determinación de las cumarinas, por ello se realizaron pruebas específicas (Rojas & Tomás, 2010)

Cumarina volátil. En un tubo de ensayo se puso 1 mL de la solución acuosa y se dejó en ebullición por 5 minutos. Luego se cubrió el tubo de ensayo con un papel filtro blanco al cual se le agregaron unas gotas de NaOH al 10% (p/v) y se dejó durante 5 minutos. Finalmente se observó bajo luz ultravioleta a 365 nm para corroborar la aparición de una coloración fluorescente.

Cumarina fija. Sobre papel filtro se colocó una gota de NaOH al 10% con la solución acuosa, y en otro papel sólo una gota de NaOH como control durante 5 minutos. Seguidamente se observó bajo luz ultravioleta a 365 nm para corroborar la aparición de una coloración fluorescente.

Lectura al espectrofotómetro. La solución acuosa se diluyó en una solución (v/v) de agua destilada y metanol. Seguidamente se realizó la

lectura del espectro UV en el equipo UV-visible Spectrophotometer (Thermo Scientific Helios γ) de 190 a 750 nm.

V. RESULTADOS

5.1 Selección de cepas de actinomicetos por su actividad antiparasitaria

La primera prueba se realizó frente a *Leishmania (V.) peruviana*, en la cual se enfrentaron tanto el control de crecimiento (C. crec.), control de inhibición (C. inh.), control del medio Scheneider's y caldo marino (Sch+CM); además de los fermentos respectivos a las 4 cepas de actinomicetos.

Los resultados se muestran en la Figura 3 donde las curvas de crecimiento tuvieron distintos comportamientos según cada tratamiento. En el caso de los fermentos de las cepas 13A1, EIIIA y EIIC se observó al inicio una ligera inhibición ya que el número de parásitos contados fue menor que el control de crecimiento y el control del medio; pero manteniendo aún presencia de parásitos más que en el control de inhibición. Sin embargo, al segundo día de la prueba se observó una mayor diferencia con respecto al control de inhibición, lo cual contrastaba con los resultados mostrados con el fermento de la cepa EIIB, el cual mantuvo la cantidad de parásitos similar al control de inhibición. A partir del tercer día de la prueba, se manifestó la diferencia marcada en las curvas de crecimiento, siendo el fermento de la cepa EIIB el más similar al control de inhibición.

La segunda prueba se realizó para *Leishmania (V.) braziliensis*, la cual tuvo las mismas condiciones que la prueba para *Leishmania (V.) peruviana*, mencionadas anteriormente.

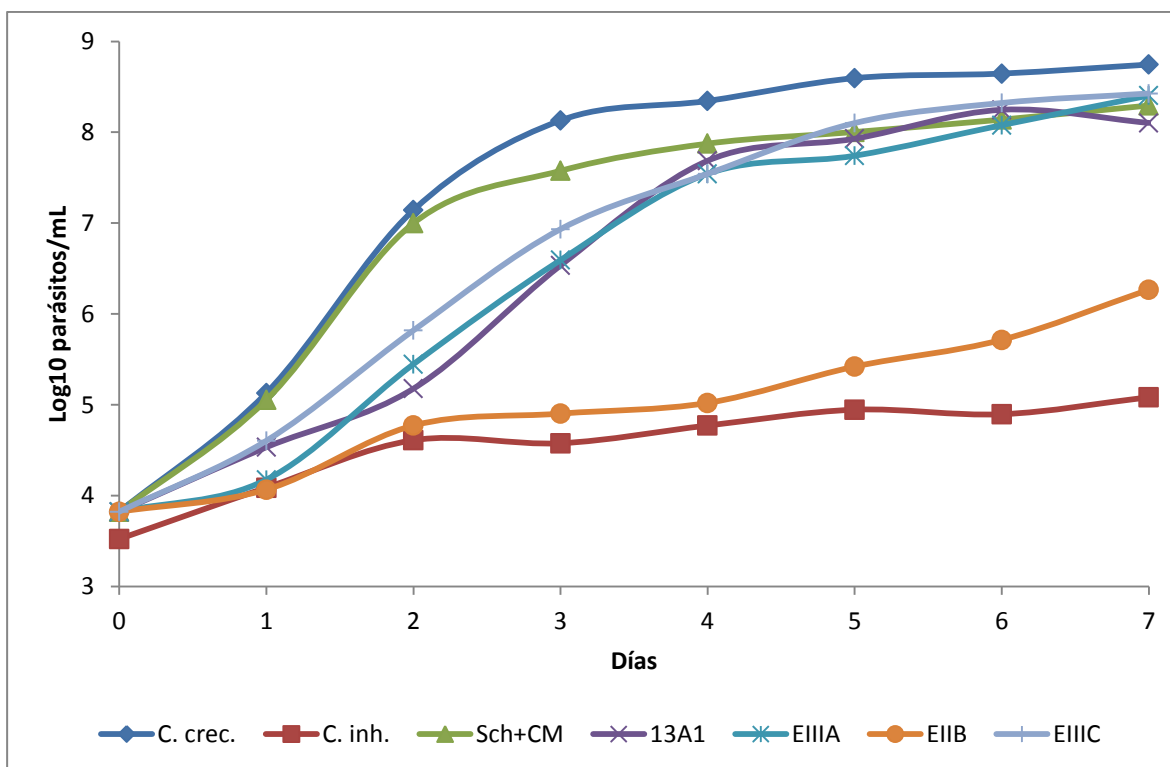


Figura 3. Prueba de actividad antiparasitaria de fermentos frente a *Leishmania (V.) peruviana*

Los resultados se muestran en la Figura 4, observándose que las curvas de crecimiento tuvieron comportamientos muy marcados según cada tratamiento. Al igual que la prueba para *Leishmania (V.) peruviana*, los fermentos de las cepas 13A1, EIIIA y EIIC; al inicio mostraron una ligera inhibición. Sin embargo, a partir del segundo día de la prueba se observó un gran cambio, ya que la cantidad de parásitos fue más similar a la del control de crecimiento. Estos resultados contrastan con los obtenidos por el fermento de la cepa EIIB, el cual mantuvo la cantidad de parásitos más similar al control de inhibición hasta la finalización de la prueba.

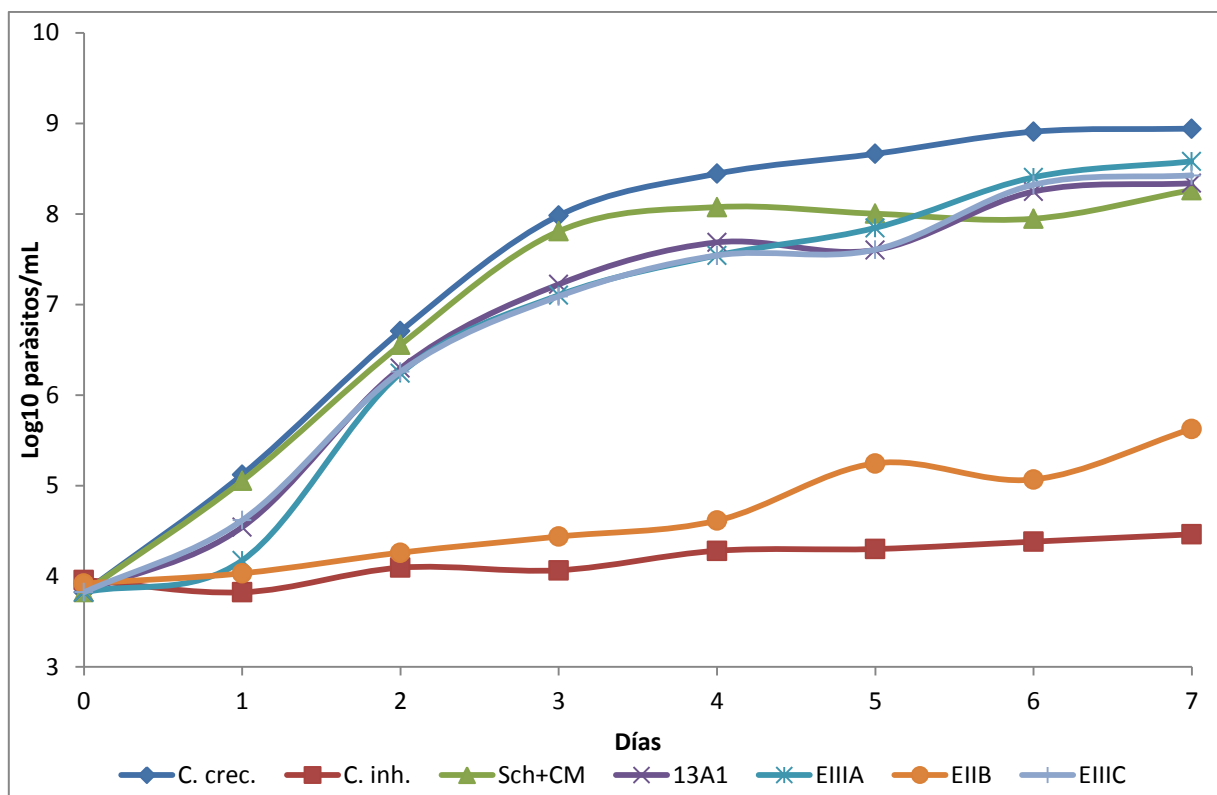


Figura 4. Prueba de actividad antiparasitaria de fermentos frente a *Leishmania (V.) braziliensis*

Debido a los resultados obtenidos de estas pruebas preliminares frente a *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*; se eligió a la cepa de actinomiceto EIIB para continuar con la extracción de metabolitos secundarios, ya que fue el único fermento que mostró comportamiento similar al control de inhibición.

5.2 Prueba de actividad antiparasitaria frente a *Leishmania (V.) peruviana*

En esta prueba se enfrentaron dos tipos de extractos orgánicos a partir del fermento de la cepa EIIIB. El extracto diclorometánico y butanólico; ambos a la concentración de 30 000 µg/mL.

Los resultados obtenidos en esta prueba son mostrados en la Figura 5; además los promedios de los conteos diarios de parásitos/mL para cada tratamiento, son presentados en la Tabla 2.

Tabla 2. Promedios de los conteos diarios para cada tratamiento de la prueba de actividad antiparasitaria de extracto diclorometánico y butanólico de la cepa EIIIB frente a *Leishmania (V.) peruviana*

TRATAMIENTO	Promedio de conteo de parásitos/mL por día							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Control de crecimiento	6,333	184,667	13,272,000	131,950,001	301,950,001	435,675,001	703,650,001	1,263,750,001
Control de inhibición	5,333	11,000	19,334	35,334	43,334	71,501	78,501	83,501
Extracto butanólico	6,250	7,500	9,167	10,001	10,001	11,668	11,668	12,502
Extracto diclorometánico	5,556	52,778	513,334	25,750,001	49,437,501	56,125,002	215,250,002	233,333,336

En esta prueba se observó que desde el primer día de tratamiento se manifestaron comportamientos marcados para cada tratamiento. En el caso del extracto diclorometánico, este mostró una ligera inhibición en el primer día, pero a partir del segundo día, la cantidad de parásitos aumentó considerablemente, siendo mucho mayor que el control de inhibición hasta la finalización de la prueba. Todo esto basado en los resultados de los conteos directos realizados durante toda la prueba.

El caso del extracto butanólico, a lo largo de la prueba mostró mejor actividad antiparasitaria incluso que el control de inhibición, ya que hasta el final de la prueba las cantidades de parásitos no aumentaron. Respecto al control de inhibición, las cantidades de parásitos no aumentaron considerablemente durante toda la prueba, pero se recuperaron los días posteriores y se observó un ligero incremento en la cantidad de parásitos.

Es por ello que luego de realizar esta prueba, se decidió probar a menor concentración el extracto butanólico de la cepa EIIB.

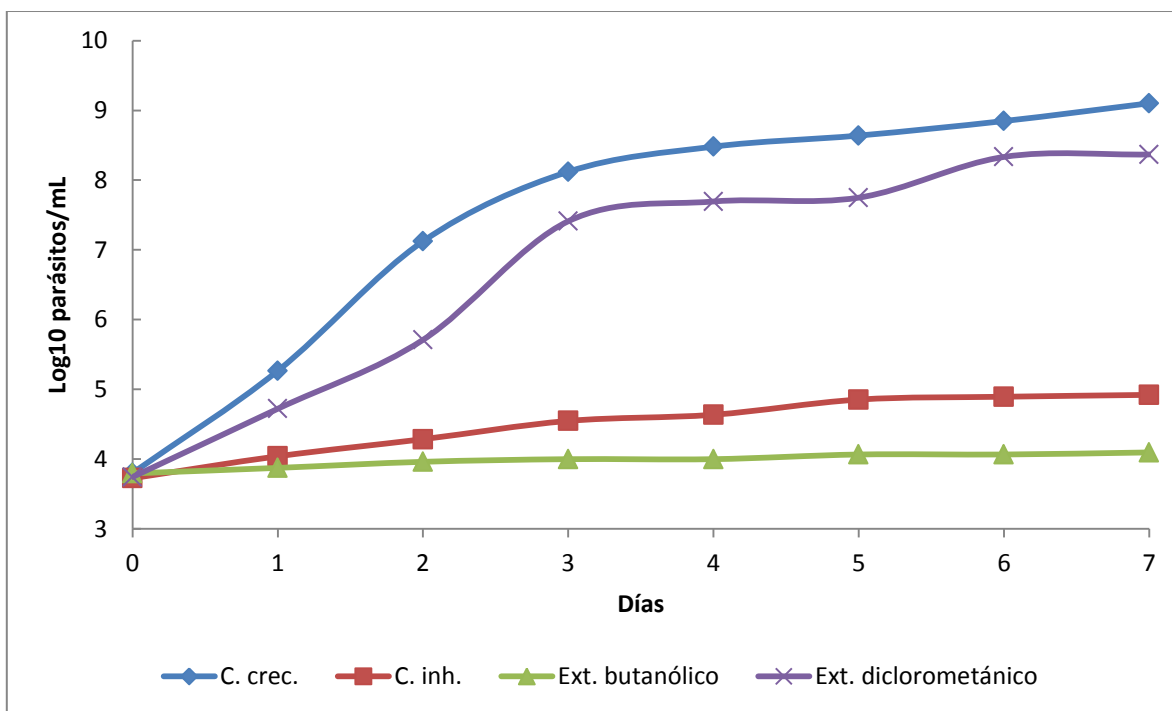


Figura 5. Prueba de actividad antiparasitaria de extracto diclorometánico y butanólico de la cepa EIIB frente a *Leishmania (V.) peruviana*.

5.2.1 Comparación entre extracto butanólico a 30 000 µg/mL y 15 000 µg/mL.

Debido a que el extracto butanólico a concentración de 30 000 µg/mL, tuvo mayor actividad que el control de inhibición, se probó este mismo extracto pero a la concentración de 15 000 µg/mL.

La Figura 6 muestra las curvas de crecimiento e inhibición obtenidas en el experimento. En este caso, ambas concentraciones del extracto butanólico tuvieron mayor actividad antiparasitaria, ya que los valores observados fueron menores que los del control de inhibición. Sin embargo, la concentración de 15 000 µg/mL se ubicó entre el extracto butanólico de 30 000 µg/mL y el control de inhibición, hasta la finalización de la prueba.

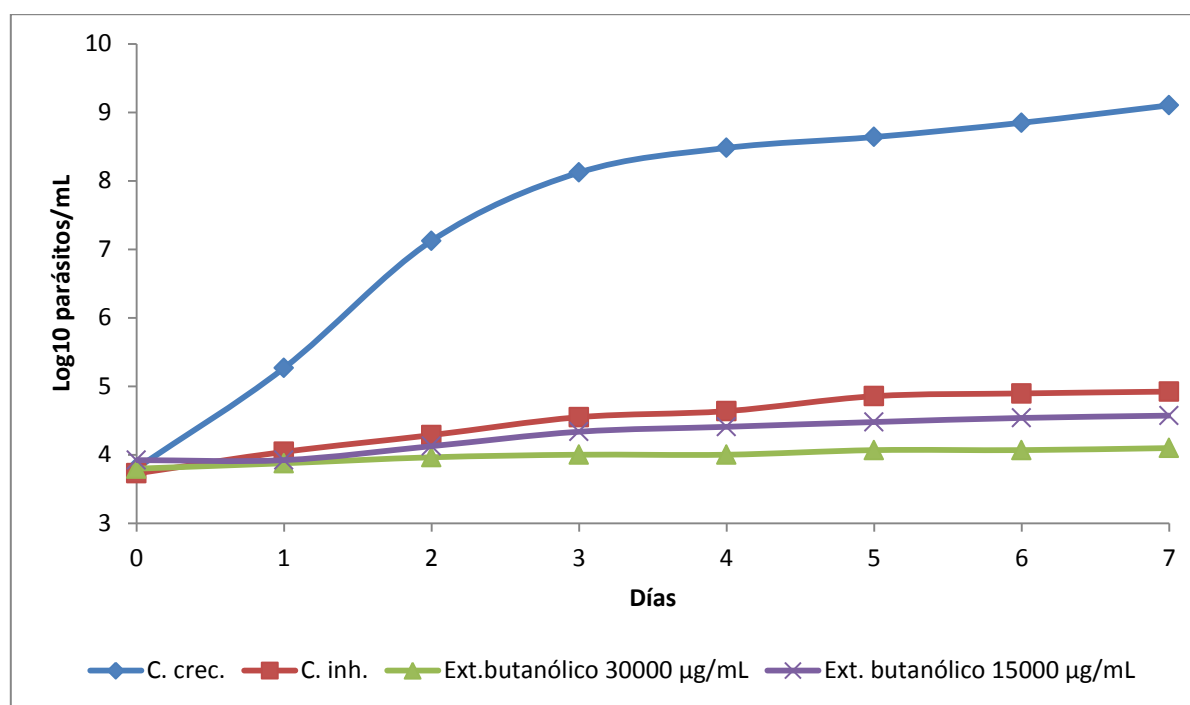


Figura 6. Prueba de actividad antiparasitaria del extracto butanólico de la cepa EIB a concentraciones 30 000 y 15 000 µg/mL frente a *Leishmania (V.) peruviana*.

Como se observó para todas las pruebas realizadas frente a *Leishmania (V.) peruviana*, el extracto butanólico de la cepa EIB presentó actividad antiparasitaria, siendo 15 000 µg/mL la menor concentración dónde se manifestó la inhibición.

Todos los datos obtenidos de las pruebas fueron analizados estadísticamente. Para el primer análisis se dividieron las pruebas por día. De este modo, se realizó el test de Kruskal-Wallis para cada día; usando como variable de contraste, el número de parásitos contados y como variable de grupo, el tipo de tratamiento (control de crecimiento, control de inhibición y extracto butanólico). La hipótesis para el día cero fue la siguiente:

H₀ : Las medianas de los conteos entre los tres tratamientos son iguales para el día cero en *Leishmania (V.) peruviana*.

H₁ : Al menos una de las medianas de uno de los tratamientos es significativamente distinta para el día cero en *Leishmania (V.) peruviana*.

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis mostraron que no existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, por lo que puede afirmarse que los valores en el día cero para los tres compuestos no son significativamente diferentes en *Leishmania (V.) peruviana* y que a pesar de no ser exactamente iguales, estos no tienen diferencia significativa como para afectar el desarrollo de la prueba (Anexo 2).

Una vez que se probó que los valores de conteo en el día cero no fueron significativamente distintos, pudo realizarse la prueba Kruskal-Wallis para cada

día, con la finalidad de demostrar si existieron diferencias entre los tratamientos analizados.

En cada uno de los días se observó un valor p menor a 0.05, con lo cual se rechazaron las hipótesis nulas respectivas; concluyendo que cada día, existió al menos un valor de mediana (según el conteo) significativamente diferente a los demás tratamientos de *Leishmania (V.) peruviana* (Anexo 3).

Seguidamente, se realizaron pruebas de comparación no paramétricas entre dos grupos de tratamientos: primero, el control de crecimiento con el del extracto butanólico y segundo, el control de inhibición con el del extracto butanólico. De esta manera se determinó cuáles de los grupos de tratamientos fue el que presentaba las diferencias calculadas en la prueba de Kruskal-Wallis.

En todos los casos, el valor p fue menor a 0.05, concluyendo que las medianas de los conteos entre los grupos Control de crecimiento - Extracto butanólico y Control de inhibición - Extracto butanólico, fueron significativamente distintas para *Leishmania (V.) peruviana*. En ambos casos, el tratamiento de Extracto butanólico presentó diferencias significativas respecto a cada grupo control; sin embargo, mediante una prueba de subconjuntos (prueba HSD de Tukey) pudo establecerse con cuál de los grupos controles el tratamiento del Extracto butanólico fue más similar.

Como se pudo observar en las Figuras 5 y 6, todos los días, el grupo control de crecimiento difirió de manera más marcada respecto a los grupos de control inhibición y el extracto butanólico. De esta manera, se puede afirmar que para

Leishmania (V.) peruviana, los conteos del tratamiento con el extracto butanólico de la cepa EIIB presentaron una mayor similaridad con los del control de inhibición.

5.3 Prueba de actividad antiparasitaria frente a *Leishmania (V.) braziliensis*

Estas pruebas se realizaron de igual manera, enfrentando dos tipos de extractos orgánicos a partir del fermento de la cepa EIIB. El extracto diclorometánico y butanólico; ambos a la concentración de 30 000 µg/mL.

Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 7; además los promedios de los conteos diarios de parásitos/mL para cada tratamiento, son presentados en la Tabla 3.

Tabla 3. Promedios de los conteos diarios para cada tratamiento de la prueba de actividad antiparasitaria de extracto diclorometánico y butanólico de la cepa EIIB frente a *Leishmania (V.) braziliensis*

TRATAMIENTO	Promedio de conteo de parásitos/mL por día							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Control de crecimiento	8,750	149,167	5,790,000	99,859,375	278,375,000	460,875,000	809,625,000	873,750,000
Control de inhibición	9,167	12,083	16,667	27,500	45,000	97,500	122,500	425,000
Extracto butanólico	8,889	10,556	9,444	11,111	15,556	13,333	15,000	15,556
Extracto Diclorometánico	8,333	54,167	2,070,000	56,531,250	51,500,000	104,250,000	209,500,000	272,968,750

En esta prueba también se observó desde el primer día de tratamiento los comportamientos marcados para cada tratamiento. En el caso del extracto diclorometánico, este manifestó una ligera inhibición en el primer día, pero a partir del segundo día y hasta la finalización de la prueba, la diferencia fue mucho mayor respecto al control de inhibición.

El caso del extracto butanólico, a lo largo de la prueba manifestó mayor actividad antiparasitaria incluso que el control de inhibición, ya que hasta el final de la prueba las cantidades de parásitos no se incrementaron. Respecto al control de inhibición, las cantidades de parásitos no aumentaron considerablemente durante los primeros días la prueba, sin embargo a partir del cuarto día hasta se observó un gradual incremento en la cantidad de parásitos.

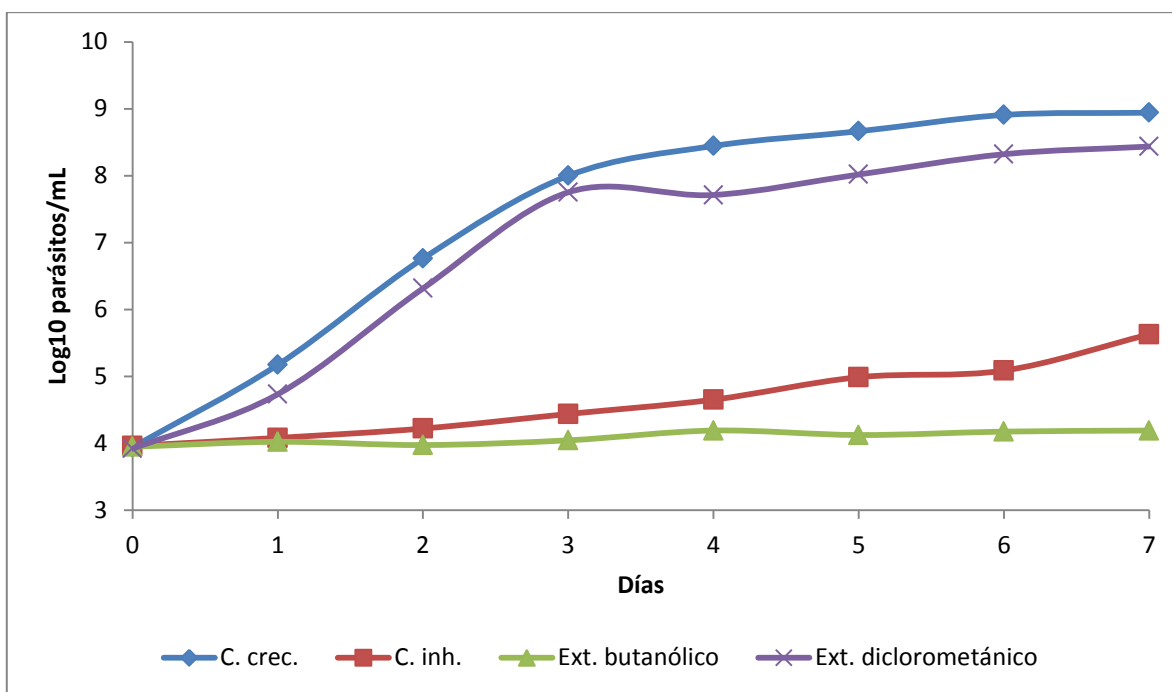


Figura 7. Prueba de actividad antiparasitaria de extracto diclorometánico y butanólico de la cepa EIIB frente a *Leishmania (V.) braziliensis*.

Al finalizar esta prueba, se decidió evaluar a menor concentración el extracto de butanólico de la cepa EIIB, ya que fue el que manifestó actividad antiparasitaria resaltante.

5.3.1 Comparación entre extracto butanólico a 30 000 µg/mL y 15 000 µg/mL.

Debido a que el extracto butanólico a concentración de 30 000 µg/mL, tuvo mayor actividad que el control de inhibición, se evaluó este mismo extracto pero a la concentración de 15 000 µg/mL.

En la Figura 8 se observan las curvas de crecimiento e inhibición obtenidas en el experimento. En este caso, el extracto a concentración 15 000 µg/mL sólo al inicio incrementó ligeramente la cantidad de parásitos, pero luego mantuvo el número durante toda la prueba. Los resultados de las concentraciones de 15 000 µg/mL y 30 000 µg/mL, finalmente tuvieron valores menores que los del control de inhibición.

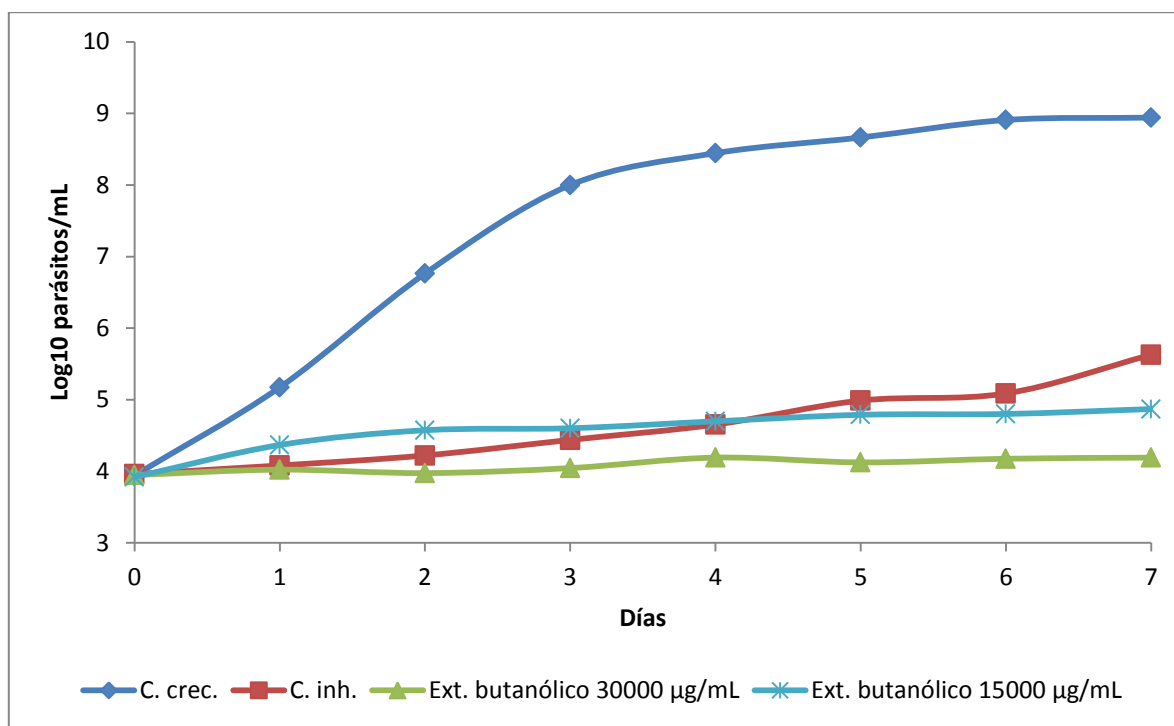


Figura 8. Prueba de actividad antiparasitaria del extracto butanólico de la cepa E11B a concentraciones 30 000 y 15 000 µg/mL frente a *Leishmania (V.) braziliensis*.

Como se demostró, para todas estas pruebas realizadas frente a *Leishmania (V.) braziliensis*, el extracto butanólico de la cepa EIB presentó actividad antiparasitaria, siendo 15 000 µg/mL la menor concentración dónde se manifestó la inhibición.

Todos los datos obtenidos de las pruebas fueron analizados estadísticamente. Para el primer análisis se dividieron las pruebas por día. De este modo, se realizó el test de Kruskal-Wallis para cada día; usando como variable de contraste, el número de parásitos contados y como variable de grupo, el tipo de tratamiento (control de crecimiento, control de inhibición y extracto butanólico). La hipótesis para el día cero fue la siguiente:

H₀ : Las medianas de los conteos entre los tres tratamientos son iguales para el día cero en *Leishmania (V.) braziliensis*.

H₁ : Al menos una de las medianas de uno de los tratamientos es significativamente distinta para el día cero en *Leishmania (V.) braziliensis*.

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis mostraron que no existe evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, por lo que puede afirmarse que los valores en el día cero para los tres compuestos no son significativamente diferentes en *Leishmania (V.) braziliensis* y que a pesar de no ser exactamente iguales, estos no tienen diferencia significativa como para afectar el desarrollo de la prueba. (Anexo 4)

Una vez que se probó que los valores de conteo en el día cero no fueron significativamente distintos, pudo realizarse la prueba Kruskal-Wallis para cada día, con la finalidad de demostrar si existieron diferencias entre los tratamientos analizados.

En cada uno de los días se observó un valor p menor a 0.05, con lo cual se rechazaron las hipótesis nulas respectivas; concluyendo que cada día, existió al menos un valor de mediana (según el conteo) significativamente diferente a los demás tratamientos de *Leishmania (V.) braziliensis*. (Anexo 5)

Seguidamente, se realizaron pruebas de comparación no paramétricas entre dos grupos de tratamientos: primero, el control de crecimiento con el del extracto butanólico y segundo, el control de inhibición con el del extracto butanólico. De esta manera se determinó cuáles de los grupos de tratamientos fue el que presentaba las diferencias calculadas en la prueba de Kruskal-Wallis.

En todos los casos, el valor p fue menor a 0.05, concluyendo que las medianas de los conteos entre los grupos Control de crecimiento - Extracto butanólico y Control de inhibición - Extracto butanólico, fueron significativamente distintas para *Leishmania (V.) braziliensis*. En ambos casos, el tratamiento de Extracto butanólico presentó diferencias significativas respecto a cada grupo control; sin embargo, mediante una prueba de subconjuntos (prueba HSD de Tukey) pudo establecerse con cuál de los grupos controles el tratamiento del Extracto butanólico fue más similar.

Como se pudo observar en las Figuras 7 y 8, todos los días, el grupo control de crecimiento difirió de manera más marcada respecto a los grupos de control inhibición y el extracto butanólico. De esta manera, se puede afirmar que para *Leishmania (V.) braziliensis*, los conteos del tratamiento con el extracto butanólico de la cepa EIIB presentaron una mayor similaridad con los del control de inhibición.

5.4 Caracterización de cultivos de actinomicetos

5.4.1 Caracterización fenotípica

Las principales características culturales del actinomiceto aislado de esponjas marinas con código EIIB fueron las siguientes:

En Agar Marino la colonia formada inicialmente fue ligeramente húmeda y poco brillante, pero con el transcurrir de los días se volvió opaca y seca adquiriendo una apariencia yesosa y pulverulenta, característica de este tipo de bacterias, además esta cepa mostró buen crecimiento ya que los diámetros de la colonia variaron entre 14 a 18 mm (Figura 9).



Figura 9. Cepa EIIB en Agar Marino, obsérvese la apariencia yesosa y pulverulenta del micelio aéreo.

La coloración del micelio aéreo fue beige claro y el micelio de sustrato beige oscuro. No presentó pigmentos difusibles en el medio. El crecimiento en Caldo Marino fue abundante, formándose colonias pequeñas de color beige en la superficie.

En la coloración Gram se observaron los filamentos característicos Gram positivos, además de la presencia de esporas; asimismo con la técnica de microcultivo se observaron las hifas curvadas, característica del género *Streptomyces*, ver Figura 10.

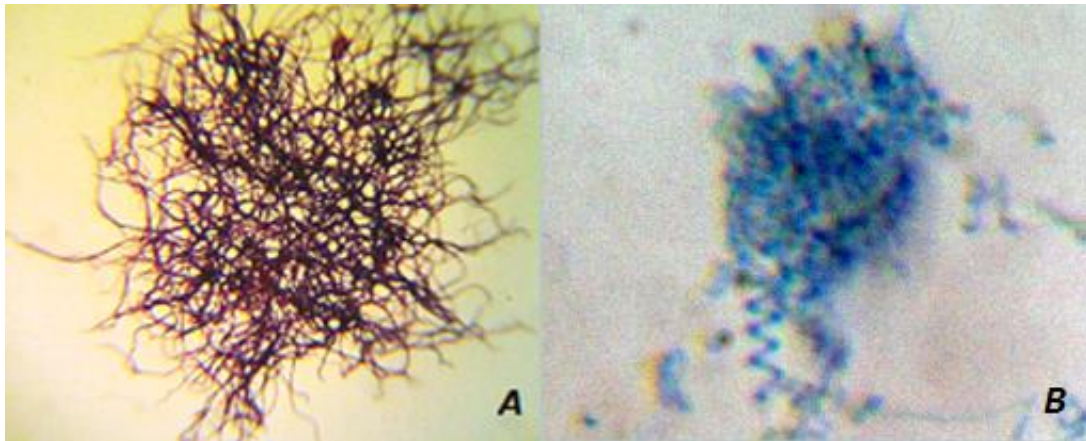


Figura 10. Observación de las características microscópicas de la cepa EIIB. (A) Coloración Gram a cultivo de 2 días, donde las hifas están en formación. (B) Microcultivo de 7 días, teñido con azul de Lactofenol, obsérvese la curvatura terminal de las hifas, característica del género *Streptomyces*. Aumento: 1000x.

En relación a la actividad enzimática presentada por la cepa EIIB, los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividad enzimática presentada por la cepa EIIB

Sustratos	Actividad enzimática	Diámetro de halo (mm)
Almidón	+	34
Úrea	-	--
Caseína	+	32
Celulosa	-	--
Tween 80	+	25
Gelatina	+	31

5.4.2 Microscopia electrónica

Las observaciones se realizaron con muestras de 2 y 7 días de crecimiento en caldo marino. El cultivo de 2 días se observa en la Figura 11, donde claramente las hifas aun no son muy abundantes y están empezando con el proceso de la ramificación.

En la fotografía del cultivo de 7 días, se pudo observar por un lado las esporas con algunas terminaciones de hifas curvadas característica del género *Streptomyces* (Figura 12). En otra microfotografía se observa el conjunto de hifas muy enmarañadas y empezando a curvarse (Figura 13).

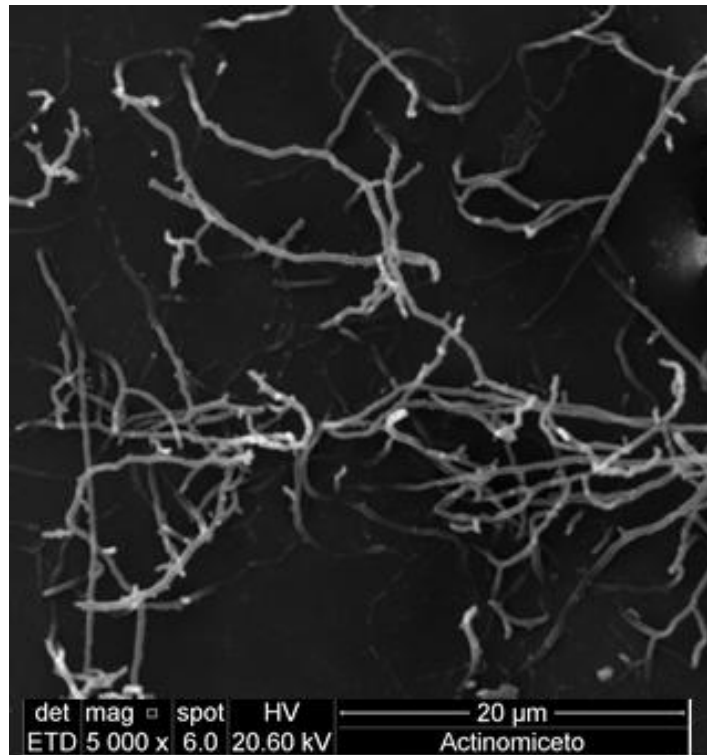


Figura 11. Cultivo de 2 días de cepa EIIB vista al Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). Obsérvese el crecimiento inicial de las hifas y su ramificación. Vista a 5000x.



Figura 12. Cultivo de 7 días de la cepa EIIB. Obsérvese las esporas y la curvatura final de la hifa (flecha). Vista a 6000x.

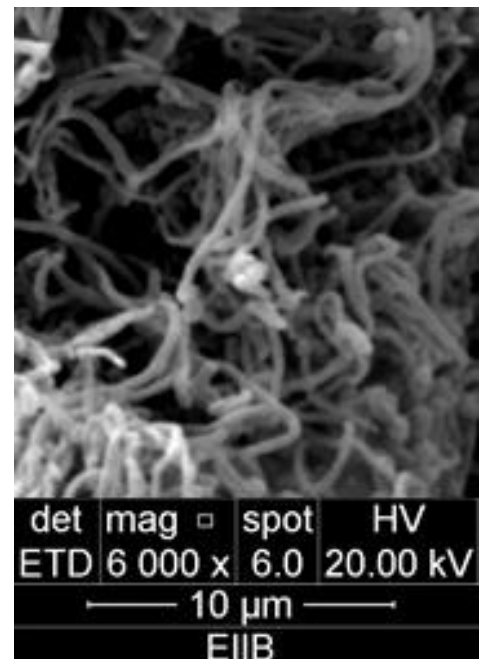


Figura 13 Cultivo de 7 días de la cepa EIIB. Obsérvese la abundancia de hifas además de su curvatura. Vista a 6000x.

5.4.3 Identificación molecular

En el secuenciamiento del gen RNAr 16S de la cepa EIIB se obtuvo 1 338 pares de bases (pb), la cual fue comparada e identificada como *Streptomyces* sp. En la base de datos de GenBank se obtuvo como resultado con el máximo score 2455 y una similitud del 99% con *Streptomyces albidoflavus* M-33 (HG965213.1), *Streptomyces daghestanicus* 7-5 (KJ571054.1), *Streptomyces somaliensis* 5-8 (KJ571046.1), *Streptomyces violascens* 5-4 (KJ571044.1), *Streptomyces exfoliatus* 3-11 (KJ571038.1). Esto nos indica que efectivamente nuestra cepa de actinomiceto EIIB pertenece al género *Streptomyces*, quedando por determinar su especie (Anexo 6).

5.5 Caracterización química preliminar del compuesto con actividad antiparasitaria

Los resultados de las pruebas químicas preliminares realizadas al extracto como determinación de triterpenoides, leucoanticianidinas, quinonas, saponinas, antraquinonas, flavonoides y alcaloides, fueron negativas; siendo el único resultado positivo para las cumarinas.

En el caso de las pruebas de Cumarina volátil y fijas se observó la aparición de coloración fluorescente bajo luz ultravioleta a 365 nm, donde la más fuerte fue para la cumarina fija, presentando una fluorescencia de color verde-amarilla, lo cual indica la posible presencia de furanocumarinas (Rojas & Tomás, 2010).

Lectura al espectrofotómetro.

Se observó la mayor absorbancia en el rango de 210 a 225 nm, además de un ligero aumento en el rango de 250 a 300 nm, como se muestra en la Figura 14, lo cual manifiesta que el extracto tiene como compuesto mayoritario a las cumarinas ya que estas presentan absorbancias dentro de esos rangos.

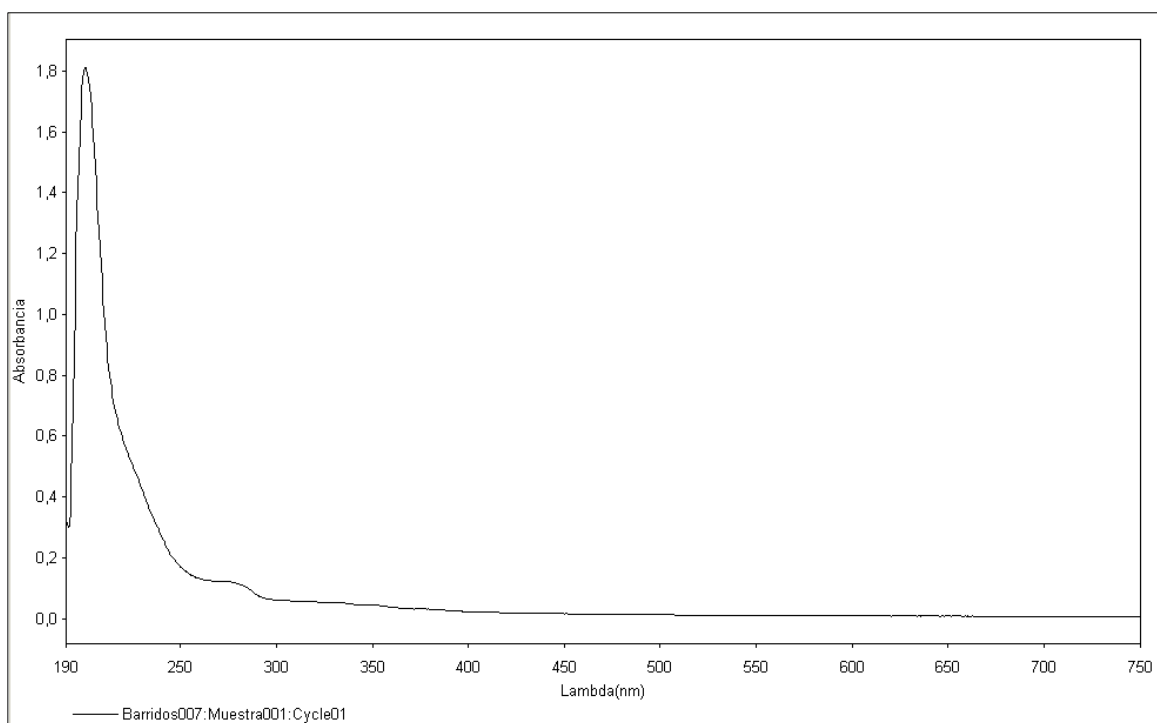


Figura 14. Lectura al espectrofotómetro en el rango de 190 a 750 nm, obsérvese las mayores absorbancias entre 210 a 225 nm.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Actividad antiparasitaria

Los resultados obtenidos muestran que el extracto butanólico de la cepa EIIB presenta actividad antiparasitaria frente a cultivos en estadio de promastigote de *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*, siendo 15 000 µg/mL la menor concentración donde se manifestó la inhibición. Además es importante resaltar que durante todas las pruebas, la cantidad de parásitos, para este tratamiento, fue menor que el control de inhibición estibogluconato sódico a 20 000 µg/mL. Estos resultados para el estibogluconato sódico, concuerdan con los obtenidos por (Callahan *et al.*, 1997), donde el valor del IC₅₀ para la prueba con promastigotes de la cepa *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379 es de 11 000 ± 2 000 µg/mL.

Es importante señalar que la sensibilidad de las cepas de *Leishmania* para los antiparasitarios, varían significativamente según su estadio evaluado. Esto se manifiesta claramente en los resultados obtenidos por (Callahan *et al.*, 1997), donde para la cepa de *Leishmania mexicana* MNYC/BZ/62/M379 la diferencia entre el valor de IC₅₀ del estibogluconato sódico frente al estadio de promastigote es de 11 000 ± 2 000 µg/mL, amastigote axénico es de 30 ± 6 µg/mL y para los amastigotes en macrófagos es 29 ± 3 µg/mL. Esto demuestra que la concentración inhibitoria del antiparasitario varía en hasta 400 veces su concentración, sólo dependiendo del tipo de estadio donde se evalúe. Tomando como referencia esta información, se explican las altas concentraciones a las

cuales hemos enfrentado los cultivos de *Leishmania* (V.) *peruviana* y *Leishmania* (V.) *braziliensis*, ya que se probaron en el estadio de promastigote.

Los resultados obtenidos con el macrólido Megalomicina por Bonay *et al.*, (1998), frente a *Leishmania major* M-HOM-Su-73-Saskh y *Leishmania donovani* M-HOM-In-80-DD8, mencionan que el IC₅₀ fue de 3 a 8 µg/mL; lo cual contrasta ampliamente con nuestros resultados. Sin embargo, señala que los valores frente a las cepas del género *Leishmania* presentaron menor porcentaje de inhibición que las cepas de *Trypanosoma brucei*, donde el valor de IC₅₀ es 2 µg/mL. El autor obtiene el metabolito a partir de la cepa *Micromonospora megalomicea* ATCC 27598, donde el volumen final de la fermentación es de 4 L, para luego proceder a la extracción con etil acetato dos veces, finalmente la pureza del extracto se evaluó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y cromatografía en capa fina; estimándose la pureza de la preparación en 90%. En nuestro caso el volumen máximo de fermentación fue de 200 mL por cada matraz, y la extracción del metabolito se realizó con butanol y diclorometano; además no se pudo evaluar la pureza, sólo el peso seco, que tuvo un rango de 150 a 200 mg para un volumen de 400 mL de fermento. La concentración de los metabolitos a través del uso de solventes orgánicos, se hizo evidente al comparar las pruebas iniciales con sólo los fermentos, donde la inhibición no fue total y estuvo por encima del control de inhibición; pero luego de la concentración con los solventes la inhibición tanto de *Leishmania* (V.) *peruviana* y *Leishmania* (V.) *braziliensis* fue siempre inferior que el estibogluconato sódico.

En el trabajo de (Abdelmohsen *et al.*, 2010), también aíslan actinomicetos a partir de esponjas marinas, donde el porcentaje de inhibición frente a *Leishmania major* son de 24 y 36%, mientras que para la cepa de *Trypanosoma brucei* TC221 los valores van desde 19 al 48%, corroborando los resultados obtenidos por Bonay *et al.*, (1998).

Pimentel-Elardo *et al.*, (2010), obtiene cepas de *Streptomyces* sp. asociadas a esponjas marinas, las cuales enfrenta también a *Leishmania major* teniendo como $IC_{50} < 0,11 \mu M$ para el compuesto de valiomicina y $IC_{50} 5,30 \mu M$ para estaurosporina. Así mismo los enfrenta a *Trypanosoma brucei brucei* obteniendo para valiomicina $IC_{50} 0,0032 \mu M$, estaurosporina $IC_{50} 0,22 \mu M$ y butenolido $IC_{50} 31,77 \mu M$.

Para la extracción de los metabolitos Pimentel-Elardo *et al.*, (2010) también usa etil acetato y lo repite dos veces; para fraccionar el fermento usa un gradiente de agua/isopropanol seguido de metanol puro, seguidamente las fracciones son purificadas por RP-HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia de fase reversa).

Hay que resaltar que en los trabajos de Abdelmohsen *et al.*, 2010 y Pimentel-Elardo *et al.*, (2010), el seguimiento a la actividad antiparasitaria es sólo hasta las 72 horas y es evaluada de manera indirecta, ya que se emplea el colorante Azul de Alamar y se leen las absorbancias correspondientes. Es importante señalar esto ya que los datos de IC_{50} que presenta Pimentel-Elardo *et al.*, (2010) para *T. brucei* a las 72 horas son mayores a los de las 48 horas.

Galeano *et al.*, (2011) realizan pruebas con extractos diclorometánicos de esponjas marinas frente a amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares de *Leishmania panamensis*, además de amastigotes intracelulares de *Trypanosoma cruzi*. En el caso de *L. panamensis* los porcentajes de inhibición del crecimiento fueron 7,6% a la concentración de 20 μ M en amastigotes axénicos; 12,6% a una concentración de 10 μ M en los amastigotes intracelulares. Finalmente el porcentaje de inhibición para *T. cruzi* fue de 29,1% a la concentración de 10 μ M.

Comparando estos resultados con los nuestros tienen cierta similitud, ya que el extracto diclorometánico de la cepa EIIB enfrentada a *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*, no mostró actividad antiparasitaria a lo largo de la prueba, lo cual concuerda con los resultados de Galeano *et al.*, (2011), donde obtienen bajos porcentajes de inhibición empleando extractos diclorometánicos de esponjas marinas.

Si bien no existen trabajos de metabolitos de actinomicetos frente a *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*, existen reportes con el uso de extractos de plantas como es el caso de (Gomes De Lima *et al.*, 2014), donde evalúa la actividad leishmanicida del aceite de *Plectranthus amboinicus* y el extracto etanólico de *Astronium fraxinifolium* frente a promastigotes de *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM- BR-94-H3227. Los resultados obtenidos fueron que a las 48 horas el aceite de *P. amboinicus* reducía el crecimiento del parásito además que todos los extractos etanólicos inhibían totalmente el parásito a una concentración de 2,5 mg/mL. Si comparamos esta concentración con la nuestra que es de 15 000 μ g/mL, la diferencia no es tanta como las comparadas

con los resultados de los otros extractos de actinomicetos; esto podría ser debido a la especie de *Leishmania* utilizada. También realizaron pruebas en animales de las cuales el protocolo que consistió en 15 inyecciones intralesionales diarias de 20 µL de extracto etanólico de *A. fraxinifolium* a 2,5 mg/mL, resultando los perfiles de espesor de la lesión similares al tratamiento estándar con glucantime (Gomes De Lima *et al.*, 2014).

Actualmente las principales pruebas primarias disponibles para la selección de compuestos candidatos para leishmanicidas no son ideales. Primeramente porque los modelos diseñados para reflejar la situación *in vivo*, son amastigotes intracelulares y modelos animales, para los cuales la evaluación se debe de realizar con equipos especializados y el costo de los insumos es muy alto. El otro tipo de modelo diseñado para facilitar las pruebas rápidas de un gran número de fármacos, es empleando promastigotes, los cuales tienen bajo costo pero la desventaja es que el estadio del parásito no es clínicamente relevante. La recomendación que se realiza entonces es el uso de cultivos *in vitro* de los amastigotes axénicos, lo cual permite el desarrollo de las pruebas primarias de forma más rápida y fácil ya que el manejo es cómo usar un parásito en estadio promastigote pero con una representatividad de la situación *in vivo*, ya que utiliza la etapa de parásito relevante clínicamente (Callahan *et al.*, 1997).

6.2 Caracterización fenotípica y genotípica

La cepa EIIB aislada de esponja marina presentó las características morfológicas típicas de los actinomicetos observándose colonias inicialmente húmedas y luego yeyosas. La observación al microscopio óptico se confirmó la presencia de bacterias Gram positivas filamentosas, y la observación de los microcultivos permitió la visualización de los filamentos terminales curvados, característica del género *Streptomyces* (Shirling & Gottlieb, 1966; Williams, *et al.*, 1983). La cepa tuvo gran producción de enzima amilolítica y gelatinasa; teniendo parecido a la cepa del género *Streptomyces* aislado por (Siva Kumar *et al.*, 2012) procedente de sedimentos marinos.

El uso del Microscopio Electrónico de Barrido, como una herramienta para obtener información morfológica y ayudar en la clasificación taxonómica de estas cepas, ha sido usado desde ya hace varias décadas (Williams & Davies, 1967), debido a la fina estructura de los órganos reproductivos y vegetativos del género *Streptomyces* (Kumar *et al.*, 2011). Es por ello importante comparar las características culturales, la morfología de la cadena de esporas y la superficie, para poder clasificar correctamente a estos microorganismos. En nuestro caso, se observó que las hifas poseían una curvatura final, la cual es una característica taxonómica del género *Streptomyces*.

La identificación de la cepa por métodos moleculares evidenció la amplificación por PCR del tamaño esperado según los “primers” dirigidos al ARNr 16S. Esto confirmó que el microorganismo aislado pertenece al dominio Bacteria y que el

ADN extraído era amplificable por PCR, es decir, no poseía trazas de algún producto de la extracción (como etanol, cloroformo, etc) que impidiera la reacción de PCR. Para conocer la identidad de la cepa, se envió a secuenciar los fragmentos amplificados y se analizó la secuencia por comparación con la base de datos GenBank, obteniéndose porcentajes de similitud muy altos (99%) con varias especies del género *Streptomyces*, lo cual indica que con este tipo de “primers”, en nuestro caso, sólo se puede llegar a determinar hasta el género, debido a que amplifica una región muy conservada. Lo recomendable para poder identificar hasta especie es usar “primers” específicos para las actinobacterias o el género *Streptomyces*.

6.3 Caracterización química preliminar

En nuestro caso, el grupo químico presente en el extracto fue la cumarina, presentando una fluorescencia de color verde-amarilla en luz UV, además tuvo la mayor absorbancia en el rango de 210 a 225 nm y un pico más pequeño el rango de 250 a 300 nm. Estos resultados concuerdan con los reportados por (Steck & Bailey, 1969) en la caracterización de cumarinas en muestras de plantas, mencionando que en general los compuestos de furano poseen una fluorescencia amarillenta opaca bajo luz UV, mientras que la mayoría de las otras cumarinas presentan fluorescencia violeta o azul. Además se menciona que los derivados de 7- y 5,7- hidroxycumarina tienen una alta absorbancia a 320-330 nm, mientras que los derivados 6,7- tienen un pico a 340-350 nm; la absorbancia de las furanocumarinas está dentro de 290-310 nm y también en la región de 240-270

nm. Cabe mencionar que en el trabajo (Steck& Bailey, 1969) se purificó cada compuesto por cromatografía de gas-líquido, y el material recogido se analizó mediante una combinación de absorción ultravioleta y espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Existen reportes de actinomicetos que producen metabolitos tipo cumarinas, los cuales son denominados aminocumarinas. Estos son compuestos que contienen un anillo de 3-amino-4,7-dihidroxicumarina (Figura 15) (Collin *et al.*, 2011). Las aminocumarinas, novobiocinas, clorobiocinas y cumermicinas A₁, son productos naturales aislados de especies de *Streptomyces* que son usados como antibióticos que se dirigen a la ADN girasa.

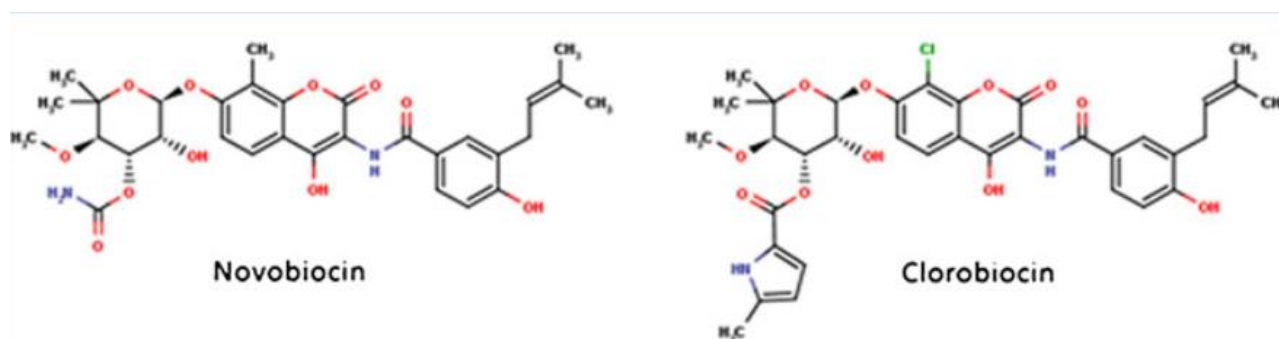


Figura 12. Estructuras químicas de clásicas aminocumarinas. Fuente: Collin *et al.*, 2011.

La novobiocina (una aminocumarina) es un potente inhibidor de la unión a la subunidad GyrB de girasa bacteriana. Este compuesto es de uso clínico con el nombre Albamicin y se utiliza en la medicina veterinaria. La novobiocina se descubrió a partir de una bacteria de origen terrestre que se denominó originalmente *Streptomyces spheroides*, que luego fue reclasificado como

Streptomyces caeruleus y finalmente como *Streptomyces niveus* NCIMB 11891 (Flinspach *et al.*, 2014). Este compuesto conocido desde 1950 por sus propiedades inhibitoras sobre la síntesis de ácido nucleico en las bacterias, se encontró más tarde, con el descubrimiento de la ADN girasa, que las aminocumarinas inhiben la girasa catalizada para el superenrollamiento de ADN, demostrándose además que inhiben la reacción girasa-ATPasa compitiendo con el ATP por la unión a GyrB (Collin *et al.*, 2011). Su sitio de unión se encuentra en el subdominio amino-terminal de 24 kDa de GyrB (Gilbert & Maxwell, 1994), un dominio que no se une ATP por sí mismo; no obstante, se superponen al sitio de unión a ATP, evitando así la unión de ATP (Lewis *et al.*, 1996).

Actualmente estas aminocumarinas son reportadas para especies aisladas de suelos y no de fuentes marinas, es por ello recomendable realizar la caracterización química del extracto butanólico de la cepa EIIB, ya que presenta este tipo de compuestos no reportados.

VII. CONCLUSIONES

- El extracto butanólico del actinomiceto EIIB aislado de una esponja marina (calcárea) presentó efectiva actividad antiparasitaria *in vitro* frente a promastigotes de *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis*; en cambio el extracto diclorometánico no presentó ninguna actividad.
- El extracto butanólico del actinomiceto EIIB mostró mayor actividad antiparasitaria *in vitro* que el antimonial de referencia estibogluconato sódico frente a promastigotes de ambas cepas de *Leishmania*.
- Existe una diferencia significativa entre los resultados del extracto butanólico con los controles correspondientes de ambas cepas de *Leishmania*.
- El tamizaje químico preliminar del extracto butanólico de la cepa EIIB determinó la presencia de cumarinas entre los metabolitos, las cuales podrían ser las responsables de la actividad anti-*Leishmania*.
- La cepa de actinomiceto EIIB con actividad anti-*Leishmania* pertenece al género *Streptomyces*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad leishmanicida del extracto butanólico de la cepa EIIB a concentraciones menores y empleando cultivos de amastigotes axénicos, debido a su fácil manejo, menor costo y su representatividad clínica.
- Determinar su posible efecto citotóxico de los metabolitos contenidos en el extracto butanólico de la cepa EIIB utilizando cultivos de líneas celulares y animales de experimentación.
- Evaluar la actividad leishmanicida frente a otras especies clínicas como *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni* y *Leishmania (V.) amazonensis* por ser representantes epidemiológicas más frecuentes en Latinoamérica.
- Evaluar la bioactividad comparativa de extractos orgánicos obtenidos con solventes de diferentes polaridades, a fin de optimizar el rendimiento antiparasitario de los metabolitos recuperados.
- Realizar estudios de fraccionamiento e identificación del (los) componente(s) responsable(s) de la actividad anti-*Leishmania* del extracto butanólico de la cepa EIIB, utilizando técnicas analíticas de mayor rendimiento como Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC), Cromatografía de Gas-Líquido (CGL) y Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
- Completar la identificación filogenética de *Streptomyces* cepa EIIB empleando “primers” específicos para especies de este género.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelmohsen, U., Pimentel-Elardo, S., Hanora, A., Radwan, M., H Abou-Ela, S., Ahmed, S., Hentschel, U. 2010. Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Marine drugs* 8(3): 399–412.
- Arévalo, J.; Ramirez, L.; Adaui, V.; Zimic, M.; Tulliano, G.; Miranda-Verástegui, C.; Lazo, M. *et al.* 2007. Influence of Leishmania (Viannia) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 195 (12): 1846–51.
- Bates, P. 2007. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies.” *International journal for parasitology* 37(10): 1097–106.
- Bermúdez, H., Rojas, E., Garcia, L., Desjeux, P., Dujardin, JC., Boelaert, M., Chappuis, F. 2006. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol* 100: 591-600.
- Bonay, P., Durán-chica, I., Fresno, M., Alcina, A., Alarco, B., Dura, I. 1998. “Antiparasitic Effects of the Intra-Golgi Transport Inhibitor Megalomicin.” *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42(10): 2668–2673.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. Bergey’s manual of determinative bacteriology. (Eighth edition), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 747 - 842.
- Burg, R., Miller, B., Baker, E., Birnbaum, J., Currie, S., Hartman, R., Monaghan, R., Putter, I., Tunac, J., Wallick, H., Stapley, E.. 1979. “Avermectins , New Family of Potent Anthelmintic Agents : Producing Organism and Fermentation”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 15(3): 361–367.

- Cáceres, A.G. y Galati, E.A.B. 2001. Lista de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) para el Perú y especies consideradas como vectores naturales e incriminadas en la transmisión de patógenos de la Leishmaniosis Tegumentaria y la Enfermedad de Carrión (verruga peruana). *Rev. Perú. med. exp. salud publica* [online], vol.18, n.3-4, pp. 100-106.
- Callahan, H L, Portal, C., Devereaux, D., Grogl, M. 1997. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41(4): 818–22.
- Collin, F., Karkare, S., Maxwell, A. 2011. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* 92(3): 479–97.
- Croft, S.L. & Yardley, V. 2002. Chemotherapy of Leishmaniasis. *Current Pharmacology* 8: 319-342.
- Croft, S.L., Sundar, S., and Fairlamb, A. 2006. “Drug Resistance in Leishmaniasis.” *Clin. Microbiol. Rev* 19(1): 111–126.
- Das S, Lyla PS, Ajmal Khan S. (2006). Application of *Streptomyces* as a probiotic in the laboratory culture of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Isr J AquacBamidgah* 58:198–204.
- Demain, L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology* 52(4): 455–63.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniosis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious. Diseases*, vol. 27, no. 5, pp. 305–318
- Dharmaraj S. 2010. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol* 26(12):2123–39.

- Flinspach, K., Rückert, C., Kalinowski, J., Heide, L., Apel, C. 2014. Draft Genome Sequence of *Streptomyces niveus* NCIMB 11891, Producer of the Aminocoumarin Antibiotic Novobiocin. *Genome Announc.* 2(1): 3–4.
- Galeano, E., Thomas, O., Robledo, S., Muñoz, D., Martinez, A. 2011. Antiparasitic bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Verongula rigida*. *Marine drugs* 9(10): 1902–13.
- Gandhimathi, R., M. Arunkumar, J. Selvin, *et al.* 2008. Antimicrobial potencial of sponge associated actinomycetes. *Journal de Micologie Medicale* 18: 16 – 22.
- Gilbert EJ, Maxwell A. 1994. The 24 kDa N-terminal sub-domain of the DNA gyrase B protein binds coumarin drugs. *Molec Microbiol* 12:365–373.
- Goodfellow M, Williams ST. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu Rev. Microbiol* 37:189–216.
- Gomes De Lima, S.C., M.J. Teixeira, J.E. Gonçalves, S.M. Morais, A.F. Torres, M.A. Braga, R.O. Rodrigues, M.P. Gilvandete, A.C. Martins, and A.T. Nagao-dias. 2014. *In Vitro* and *In Vivo* Leishmanicidal Activity of *Astronium fraxinifolium* (Schott) and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. *BioMed Research International* 2014: 7.
- Gurvitz, Aner. 2009. Identification of the *Leishmania major* proteins LmjF07.0430, LmjF07.0440, and LmjF27.2440 as components of fatty acid synthase II.” *Journal of biomedicine & biotechnology* 2009: 950864.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneathm, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn. Baltimore, MD: Williams and Williams.
- Jensen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T., Fenical, W. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental microbiology* 7(7): 1039–48.

- Kahla-Nakbi, A. Ben, Haouas, N., Ouaer, A. El, & Guerbej, H. 2010. Screening of antileishmanial activity from marine sponge extracts collected off the Tunisian coast. *Parasitol Res*, 106, 1281–1286.
- Kim TK, Garson MJ, Fuerst JA. 2005. Marine actinomycetes related to the “salinospora” group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ Microbiol*. 7:509-518
- Kumar, Vijay, Alpana Bharti, Omprakash Gusain, and Gajraj Singh Bisht. 2011. Scanning electron microscopy of *Streptomyces* without use of any chemical fixatives. *Scanning* 33(6): 446–9.
- Leiva, S; Yañez, M; Zaror, L; Rodriguez, H; García, H. 2004. Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Revista médica de Chile*. 132 (2):151-159.
- León, J., Aponte, J., Rojas, R., Cuadra, D’L., Ayala, N., Tomás, G., Guerrero, M. 2011. Estudio de actinomicetos marinos aislados de la costa central del Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 28(2): 4–5.
- Lewis RJ, Singh OMP, Smith CV, Skarynski T, Maxwell A, Wonacott AJ, Wigley DB. 1996. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J* 15:1412–142
- Lucas C., A. Franke, M. Cachay, A. Tejada, M. Cruz, R. Kreutzer, D. Barrer, S. McCann & D. Watts. 1998. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59:312–17.
- Manivasagan, Panchanathan, Jayachandran Venkatesan, Kannan Sivakumar, and Se-Kruskal-Wallis on Kim. 2013. Pharmaceutically active secondary

metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.014>.

- McGuire, J.M., Bunch, R.L., Anderson, R.C., Boaz, H.E., Flynn, E. H., Powell, H. M., and Smith, J. W. (1952). *Antibiot. Chemother.* 2, 281.
- Ministerio de Salud del Perú. Dirección General de Epidemiología. Sala Situacional para el Análisis de Situación de Salud. Disponible en: http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=121
- Montalvo NF, Mohamed NM, Enthiknap JJ, Hill RT, 2005. Novel actinobacteria from marine sponges. *Anton Leeuwenhoek*. 87: 29-36
- Muscholl – Silberhorn, A, V. Thiel & J. Imhoff. 2008. Abundance and Bioactivity of Cultured Sponge-associated Bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* Volume 55, 94–106.
- Neyra D. 1997. Las Leishmaniosis en el Perú. *Folia Dermatológica Peruana* 8:51–55.
- O'Daly, JA, and HM Spinetti. 2013. Clinical and immunological analysis of cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. *Journal of parasitology Research* 2013: 12.
- Olano, C.; Méndez, C. & Salas, J. 2009. Antitumour compounds from Marine Actinomycetes. *Mar. Drugs* 2009, 7, 210-248.
- Oliveira-Neto, MP., Schubach, A., Mattos, M., Goncalves-Costa, SC., Pirmez, C. 1997. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniosis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg.* 57:651–5
- Palacios, R., Osorio, LE., Grajalew, LF., Ochoa, MT. 2001. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meg-

lumineantimonate for cutaneous leishmaniosis due to *Leishmaniaviannia* species. *Am J Trop Med Hyg* 64:187–93.

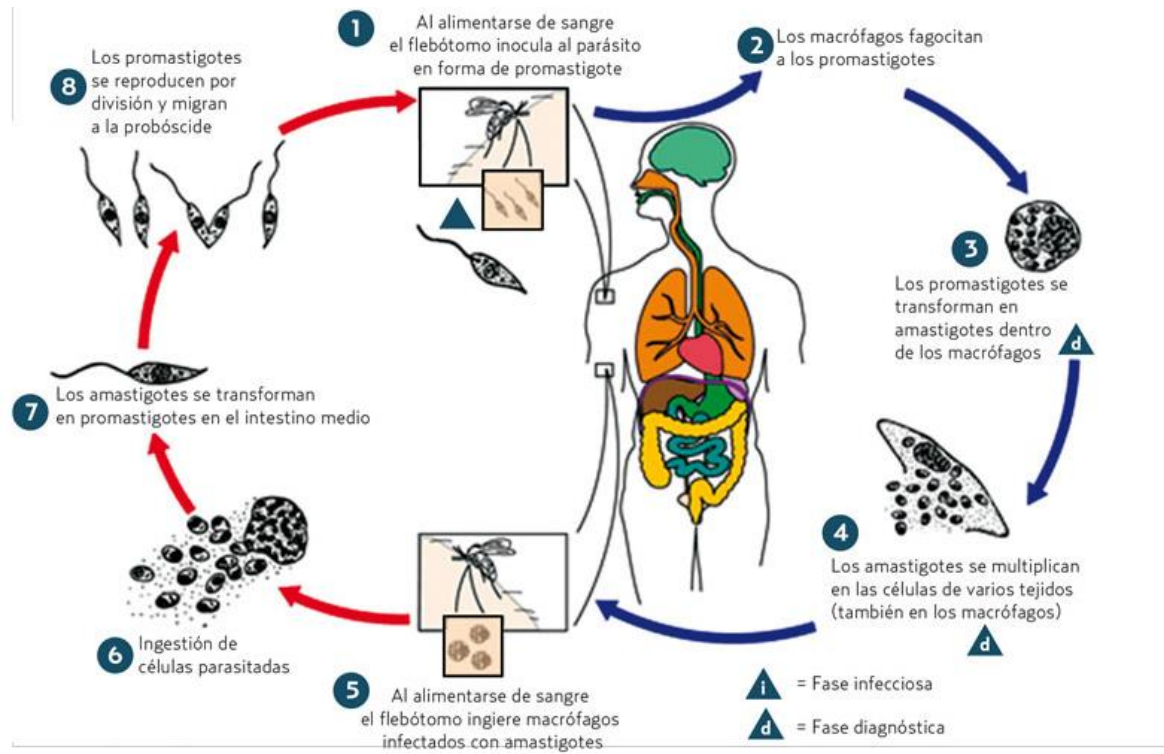
- Pimentel-Elardo, S., Kozytska, S., Bugni, T., Chris M Ireland, Heidrun Moll, and Ute Hentschel. 2010. “Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges.” *Marine drugs* 8(2): 373–80.
- Rojas, J., Tomás, G. 2010. Tamizaje fitoquímico y actividad antioxidante *in vitro* de *Passifloraedulissims* (Maracuyá). *Rev. Per.quím. Ing.Quím.* 13: 23–29.
- Salazar, R. 2008. Simposium de Infectología (Primera parte). Diagnóstico, 47(4), Octubre – Diciembre.
- Salud, M. D. 2013. Boletín Epidemiológico (Lima), 21(52). Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/boletines/2012/52.pdf>
- Shirling, E.B., and Gottlieb, D. 1966. “Methods for characterization of *Streptomyces* species.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 16(3): 313–340.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* ; 99:239–51
- Siva Kumar, K., Haritha, R., Swathi, A., Sirisha, B., Ramana, T. 2012. “Taxonomy and Antimicrobial activity of *Streptomyces coeruleorubidus* sp. Isolated from marine sediment.” *Research Journal of Microbiology* 7(3): 171–181.
- Solanki, Renu, Monisha Khanna, and Rup Lal. 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian journal of microbiology* 48(4): 410–31.
- Steck, W. & Bailey, B. K. 1969. Characterization of plant coumarins by combined gas chromatography , ultraviolet absorption spectroscopy , and nuclear magnetic resonance analysis1. *Canadian Journal of Chemistry* 47(10860).

- Subramani, R. and Aalbersberg, W. 2012. Marine actinomycetes : An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research* 167(10): 571–580.
- Sylvia, D; Fuhrmann, J; Hartel, P; Zuberer D. 2005. Principles and applications of soil microbiology. Second Edition. U.S.A. Pearson/Prentice Hall. 550 p. ISBN: 0-13-459991-8.
- Takizawa, M.; Colwell, R.R.; Hill, R.T. (1993). Isolation and Diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(4): 997-1002.
- Taylor, W; Hill, R.; Piel, J.; et al. 2007. Soaking it up: the complex lives of marine sponges and their microbial associates. *The ISME Journal* 1:187–190
- Urbina, J.A.; Cocampo, R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversias and advances. *Trends in Parasitology*, 19 (11): 495-501.
- Wang, G. 2006. Diversity and Biotechnological potencial of sponge associated microbial consortia. *Journal Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 545–551.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Arch Microbiol* 176(5):386–90
- Weinstein, M.J., Wagman, G.H., Marquez, J.A., Testa, R.T., Oden, E., Waitz, J.A. (1969). Megalomycin, a new antibiotic complex produced by *Micromonospora*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 22: 253-258
- Weyland H. 1969 Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature*; 223:858.
- WHO. (2012). Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide. Disponible en: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis CL 2013.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png)

- Williams, S T, and F L Davies. 1967. "Use of scanning electron microscope for the examination of actinomycetes." *Journal of general microbiology* 48(2): 171–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6038890>.
- Williams, S., Goodfellow, M., Wellington, E., Vickers, J., Alderson, G., Sneath, P., Sackin, M., Montimer, A. 1983. "A Probability Matrix for Identification of some Streptomycetes." *Journal of general microbiology* 129: 1815–1830.
- Yoon, Y J, E-S Kim, Y-S Hwang, and C-Y Choi. 2004. "Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation." *Applied microbiology and biotechnology* 63(6): 626–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689246> (November 4, 2014).
- Zhang, H.; Zhang, W.; Jin, Y.; *et a.* 2008. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:241–248

X. ANEXOS

ANEXO 1. Ciclo biológico de *Leishmania*. Fuente: CDC.



Fuente: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

ANEXO 2. Resultados pruebas de Kruskal-Wallis para el día cero para *Leishmania (V.) peruviana*

(a) Rangos promedio del conteo de parásitos/mL en el día cero para *Leishmania (V.) peruviana*

Tratamiento	N	Rango promedio
Control de crecimiento	4	6,38
Control de inhibición	4	5,00
Extracto Butanólico	3	6,83
Total	11	

(b) Estadísticos de contraste^{a,b}

	Conteo
Chi-cuadrado	,682
gl	2
Sig. asintót.	,711

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento

ANEXO 3. Resultados pruebas de Kruskal-Wallis desde el día uno hasta el día siete para *Leishmania (V.) peruviana*

(a) Rangos promedio del conteo de parásitos/mL desde el día uno hasta el día siete para *Leishmania (V.) peruviana*

Rangos

Día	Tratamiento	N	Rango promedio
1	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
2	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
3	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
4	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
5	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
6	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
7	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	

(b) Estadísticos de contraste^{a,b}

Día		Conteo
1	Chi-cuadrado	9,116
	gl	2
	Sig. asintót.	,010
2	Chi-cuadrado	8,950
	gl	2
	Sig. asintót.	,011
3	Chi-cuadrado	9,074
	gl	2
	Sig. asintót.	,011
4	Chi-cuadrado	8,950
	gl	2
	Sig. asintót.	,011
5	Chi-cuadrado	8,950
	gl	2
	Sig. asintót.	,011
6	Chi-cuadrado	8,950
	gl	2
	Sig. asintót.	,011
7	Chi-cuadrado	9,074
	gl	2
	Sig. asintót.	,011

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento

ANEXO 4. Resultados pruebas de Kruskal-Wallis para el día cero para *Leishmania (V.) braziliensis*

(a) Rangos promedio del conteo de parásitos/mL en el día cero para *Leishmania (V.) braziliensis*

Rangos

Tratamiento	N	Rango promedio
Control de crecimiento	4	5,38
Control de inhibición	4	6,75
Extracto Butanólico	3	5,83
Total	11	

(a) Estadísticos de contraste^{a,b}

	Conteo
Chi-cuadrado	,506
gl	2
Sig. asintót.	,776

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento

ANEXO 5. Resultados pruebas de Kruskal-Wallis desde el día uno hasta el día siete para *Leishmania (V.) braziliensis*

(a) Rangos promedio del conteo de parásitos/mL desde el día uno hasta el día siete para *Leishmania (V.) braziliensis*

Rangos

Día	Tratamiento	N	Rango promedio
1	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	4,38
	Extracto Butanólico	3	3,50
	Total	11	
2	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
3	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
4	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
5	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
6	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	
7	Control crecimiento	4	9,50
	Control de inhibición	4	5,50
	Extracto Butanólico	3	2,00
	Total	11	

(b) Estadísticos de contraste^{a,b}

Día		Conteo
1	Chi-cuadrado	7,285
	gl	2
	Sig. asintót.	,026
2	Chi-cuadrado	8,991
	gl	2
	Sig. asintót.	,011
3	Chi-cuadrado	8,991
	gl	2
	Sig. asintót.	,011
4	Chi-cuadrado	9,116
	gl	2
	Sig. asintót.	,010
5	Chi-cuadrado	9,245
	gl	2
	Sig. asintót.	,010
6	Chi-cuadrado	9,074
	gl	2
	Sig. asintót.	,011
7	Chi-cuadrado	9,116
	gl	2
	Sig. asintót.	,010

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamiento

ANEXO 6. Resultados de comparación del secuenciamiento del gen RNAr 16S de la cepa EIIB en la base de datos GenBank.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Streptomyces albidoflavus partial 16S rRNA gene, isolate M-33	2455	2455	100%	0.0	99%	HG965213.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces daghestanicus strain 7-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	100%	0.0	99%	KJ571054.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces somaliensis strain 5-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	100%	0.0	99%	KJ571046.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces violascens strain 5-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	100%	0.0	99%	KJ571044.1
<input type="checkbox"/>	Streptomyces exfoliatus strain 3-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2455	2455	100%	0.0	99%	KJ571038.1

COMPOSICION DE MEDIO DE CULTIVO DE ACTINOMICETOS

Agar Marino

Componente	g/L
Extracto de levadura	1
Peptona de soya	4
Agar	18
Agua de mar	750mL
Agua destilada	250mL

Caldo Marino

Componente	g/L
Extracto de levadura	1
Peptona de soya	4
Glucosa	5
Agua de mar	750mL
Agua destilada	250mL

COMPOSICION DE MEDIO DE CULTIVO DE LEISHMANIA

Medio Schneider's completo

Componente	mL
Schneider's Drosophila Medium (Gibco®)	1000
Suero fetal bovino inactivado	200